

NOVEL PHYSIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCE, EPIMORPHINE, GENE CODING THE SAME AND ANTIBODY AGAINST EPIMORPHINE

Patent Number: JP6293800
Publication date: 1994-10-21
Inventor(s): HIRAI YOHEI; others: 02
Applicant(s):: BIO MATERIAL KENKYUSHO:KK
Requested Patent: ☐ JP6293800
Application JP19920301581 19921015
Priority Number(s):
IPC Classification: C07K13/00 ; A61K39/395 ; C07K15/28 ; C12N15/12 ; C12P21/08 ; G01N33/53 ; G01N33/577
EC Classification:
Equivalents:

Abstract

PURPOSE: To provide a novel physiologically active substance, epimorphine, having an action on morphogenesis of an epithelial tissue.

CONSTITUTION: This novel physiologically active substance, epimorphine, has an action on morphogenesis of an epithelial tissue, and is produced by a human or murine mesenchymal cell and can be expressed by a gene hybridized with a gene probe constituting a base sequence complementary to a base sequence of ATGCGGGACCGGCTGCCAGACCTGACGGCGTGTAGG. In iso-form of the epimorphine, the base sequences of genes coding the substances, a soluble epimorphine produced by modifying the polypeptide of the epimorphine, a polyclonal antibody and a monoclonal antibody against the epimorphine, and a method for purifying and detecting the epimorphine by the utilization of these antibodies are also included. The epimorphine is useful for clarifying the crisis mechanism of diseases caused by the abnormal morphogenesis of epithelial tissue, developing a method for diagnosing or treating the diseases, etc.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-293800

(43) 公開日 平成6年(1994)10月21日

(51) Int. Cl. ³	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 13/00		8318-4H		
A 6 1 K 39/395	N	9284-4C		
C 0 7 K 15/28		8318-4H		
		9050-4B	C 1 2 N 15/ 00	A
		9050-4B		C
審査請求 有 請求項の数19 F D (全 41 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平4-301581

(22) 出願日 平成4年(1992)10月15日

特許法第30条第1項適用申請有り 1992年5月1日、
「Cell, Vol. 69, 471-481」に発表

(71) 出願人 591082269

株式会社バイオマテリアル研究所
神奈川県横浜市栄区田谷町1番地

(72) 発明者 平井 洋平

神奈川県横浜市栄区田谷町1番地 株式会
社バイオマテリアル研究所内

(72) 発明者 高階 誠

神奈川県横浜市栄区田谷町1番地 株式会
社バイオマテリアル研究所内

(72) 発明者 武部 京子

神奈川県横浜市栄区田谷町1番地 株式会
社バイオマテリアル研究所内

(74) 代理人 弁理士 須藤 政彦

(54) 【発明の名称】 新規生体活性物質エビモルフィン、それをコードする
モルフィンに対する抗体

遺伝子及びエビ

(57) 【要約】

【目的】 上皮組織の形態形成作用を有する新規生体活
性物質エビモルフィンを提供する。

【構成】 上皮組織の形態形成作用を有し、ヒトもしくは
マウス由来の間充細胞が作る、ATG CGG GAC CGG C
TG CCA GAC CTG ACG GCG TGT AGGの塩基配列と相補的な
塩基配列で構成される遺伝子プローブとハイブリダイズ
する遺伝子によって発現され得る新規生体活性物質エビ
モルフィン及び当該エビモルフィンのアイソフォーム、
これらをコードする遺伝子の塩基配列、当該エビモルフ
ィンのポリペプチドを改変した可溶性エビモルフィン、
当該エビモルフィンに対するポリクローナル抗体とモノ
クローナル抗体、及び当該抗体を利用したエビモルフィ
ンの精製、検出法。

【効果】 上皮形態の異常に起因する疾患の発症機序の
解明、当該疾患の診断法、治療法の開発等に有用であ
る。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記の式(1)の塩基配列と相補的な塩基配列で構成される遺伝子プローブとハイブリダイズする遺伝子によって発現され得る新規生理活性物質エビモルフィン。

式(1)

ATG CGG GAC CGG CTG CCA GAC CTG ACG GCG TGT AGG

【請求項2】 ヒト由来の間充細胞が作る、前記請求項1記載の生理活性物質エビモルフィン。

【請求項3】 マウス由来の間充細胞が作る、前記請求項1記載の生理活性物質エビモルフィン。

【請求項4】 アミノ末端のアミノ酸残基の配列が、下

式(3)

Met Arg Asp Arg Leu Pro Asp Leu Thr Ala Cys Arg Lys Asn Asp Asp

5 10 15

Gly Asp Thr Val Val Val Val Glu Lys Asp His Phe Met Asp Asp Phe

20 25 30

Phe His Gln Val Glu Glu Ile Arg Asn Ser Ile Asp Lys Ile Thr Gln

35 40 45

Tyr Val Glu Glu Val Lys Lys Asn His Ser Ile Ile Leu Ser Ala Pro

50 55 60

Asn Pro Glu Gly Lys Ile Lys Glu Glu Leu Glu Asp Leu Asn Lys Glu

65 70 75 80

Ile Lys Lys Thr Ala Asn Lys Ile Arg Ala Lys Leu Lys Ala Ile Glu

85 90 95

Gln Ser Phe Asp Gln Asp Glu Ser Gly Asn Arg Thr Ser Val Asp Leu

100 105 110

Arg Ile Arg Arg Thr Gln His Ser Val Leu Ser Arg Lys Phe Val Glu

115 120 125

Ala Met Ala Glu Tyr Asn Glu Ala Gln Thr Leu Phe Arg Glu Arg Ser

130 135 140

Lys Gly Arg Ile Gln Arg Gln Leu Glu Ile Thr Gly Arg Thr Thr Thr

145 150 155 160

Asp Asp Glu Leu Glu Glu Met Leu Glu Ser Gly Lys Pro Ser Ile Phe

165 170 175

Thr Ser Asp Ile Ile Ser Asp Ser Gln Ile Thr Arg Gln Ala Leu Asn

180 185 190

Glu Ile Glu Ser Arg His Lys Asp Ile Met Lys Leu Glu Thr Ser Ile

195 200 205

Arg Glu Leu His Glu Met Phe Met Asp Met Ala Met Phe Val Glu Thr

210 215 220

Gln Gly Glu Met Ile Asn Asn Ile Glu Arg Asn Val Met Asn Ala Thr

225 230 235 240

Asp Tyr Val Glu His Ala Lys Glu Glu Thr Lys Lys Ala Ile Lys Tyr

245 250 255

Gln Ser Lys Ala Arg Arg Lys Lys Trp Ile Ile Ile Ala Val Ser Val

260 265 270

Val Leu Val Val Ile Ile Val Leu Ile Ile Gly Leu Ser Val Gly Lys

275 280 285

式(4)

記の式(2)のとおりである前記請求項1記載の生理活性物質エビモルフィン。

式(2)

Met Arg Asp Arg Leu Pro Asp Leu Thr Ala Cys

【請求項5】 ヒト由来の間充細胞が作る、前記請求項4記載の生理活性物質エビモルフィン。

【請求項6】 マウス由来の間充細胞が作る、前記請求項4記載の生理活性物質エビモルフィン。

【請求項7】 下記の式(3)、(4)、又は(5)のうちのいずれか1種のアミノ酸配列で表される、前記請求項5記載のヒトエビモルフィン。

(3)

特開平6-293800

3

4

Met Arg Asp Arg Leu Pro Asp Leu Thr Ala Cys Arg Lys Asn Asp Asp
5 10 15
Gly Asp Thr Val Val Val Val Glu Lys Asp His Phe Met Asp Asp Phe
20 25 30
Phe His Gln Val Glu Glu Ile Arg Asn Ser Ile Asp Lys Ile Thr Gln
35 40 45
Tyr Val Glu Glu Val Lys Lys Asn His Ser Ile Ile Leu Ser Ala Pro
50 55 60
Asn Pro Glu Gly Lys Ile Lys Glu Glu Leu Glu Asp Leu Asn Lys Glu
65 70 75 80
Ile Lys Lys Thr Ala Asn Lys Ile Arg Ala Lys Leu Lys Ala Ile Glu
85 90 95
Gln Ser Phe Asp Gln Asp Glu Ser Gly Asn Arg Thr Ser Val Asp Leu
100 105 110
Arg Ile Arg Arg Thr Gln His Ser Val Leu Ser Arg Lys Phe Val Glu
115 120 125
Ala Met Ala Glu Tyr Asn Glu Ala Gln Thr Leu Phe Arg Glu Arg Ser
130 135 140
Lys Gly Arg Ile Gln Arg Gln Leu Glu Ile Thr Gly Arg Thr Thr Thr
145 150 155 160
Asp Asp Glu Leu Glu Glu Met Leu Glu Ser Gly Lys Pro Ser Ile Phe
165 170 175
Thr Ser Asp Ile Ile Ser Asp Ser Gln Ile Thr Arg Gln Ala Leu Asn
180 185 190
Glu Ile Glu Ser Arg His Lys Asp Ile Met Lys Leu Glu Thr Ser Ile
195 200 205
Arg Glu Leu His Glu Met Phe Met Asp Met Ala Met Phe Val Glu Thr
210 215 220
Gln Gly Glu Met Ile Asn Asn Ile Glu Arg Asn Val Met Asn Ala Thr
225 230 235 240
Asp Tyr Val Glu His Ala Lys Glu Glu Thr Lys Lys Ala Ile Lys Tyr
245 250 255
Gln Ser Lys Ala Arg Arg Lys Leu Met Phe Ile Ile Ile Cys Val Ile
260 265 270
Val Leu Leu Val Ile Leu Gly Ile Ile Leu Ala Thr Thr Leu Ser
275 280 285

式(5)

Met Arg Asp Arg Leu Pro Asp Leu Thr Ala Cys Arg Lys Asn Asp Asp
5 10 15
Gly Asp Thr Val Val Val Val Glu Lys Asp His Phe Met Asp Asp Phe
20 25 30
Phe His Gln Val Glu Glu Ile Arg Asn Ser Ile Asp Lys Ile Thr Gln
35 40 45
Tyr Val Glu Glu Val Lys Lys Asn His Ser Ile Ile Leu Ser Ala Pro
50 55 60
Asn Pro Glu Gly Lys Ile Lys Glu Glu Leu Glu Asp Leu Asn Lys Glu
65 70 75 80
Ile Lys Lys Thr Ala Asn Lys Ile Arg Ala Lys Leu Lys Ala Ile Glu
85 90 95
Gln Ser Phe Asp Gln Asp Glu Ser Gly Asn Arg Thr Ser Val Asp Leu

5 100 105 110 6

Arg Ile Arg Arg Thr Gln His Ser Val Leu Ser Arg Lys Phe Val Glu
 115 120 125
 Ala Met Ala Glu Tyr Asn Glu Ala Gln Thr Leu Phe Arg Glu Arg Ser
 130 135 140
 Lys Gly Arg Ile Gln Arg Gln Leu Glu Ile Thr Gly Arg Thr Thr Thr
 145 150 155 160
 Asp Asp Glu Leu Glu Glu Met Leu Glu Ser Gly Lys Pro Ser Ile Phe
 165 170 175
 Thr Ser Asp Ile Ile Ser Asp Ser Gln Ile Thr Arg Gln Ala Leu Asn
 180 185 190
 Glu Ile Glu Ser Arg His Lys Asp Ile Met Lys Leu Glu Thr Ser Ile
 195 200 205
 Arg Glu Leu His Glu Met Phe Met Asp Met Ala Met Phe Val Glu Thr
 210 215 220
 Gln Gly Glu Met Ile Asn Asn Ile Glu Arg Asn Val Met Asn Ala Thr
 225 230 235 240
 Asp Tyr Val Glu His Ala Lys Glu Glu Thr Lys Lys Ala Ile Lys Tyr
 245 250 255
 Gln Ser Lys Ala Arg Arg Gln Gln His Cys His Ser Asn His Ile Pro
 260 265 270
 Arg Ala Ile Tyr Pro
 275

【請求項8】 下記の式(6)、(7)、又は(8)の 7記載のヒトエビモルフィンをコードする遺伝子。
 うちのいずれか1種の塩基配列で表される、前記請求項

式(6)

ATG CGG GAC CGG CTG CCA GAC CTG ACG GCG TGT AGG AAG AAT GAT GAT 16
 GGA GAC ACA GTT GTT GTG GTT GAG AAA GAT CAT TTC ATG GAT GAT TTC 32
 TTC CAT CAG GTG GAG GAG ATT AGA AAC AGT ATT GAT AAA ATA ACT CAA 48
 TAT GTT GAA GAA GTA AAG AAA AAC CAC AGC ATC ATT CTT TCT GCA CCA 64
 AAC CCG GAA GGA AAA ATA AAA GAA GAG CTT GAA GAT CTG AAC AAA GAA 80
 ATC AAG AAA ACT GCG AAT AAA ATT CGA GGC AAG TTA AAG GCT ATT GAA 96
 CAA AGT TTT GAT CAG GAT GAG AGT GGG AAC CGG ACT TCA GTG GAT CTT 112
 CGG ATA CGA AGA ACC CAG CAT TCG GTG CTG TCT CGG AAG TTT GTG GAA 128
 GCC ATG GCG GAG TAC AAT GAG GCA CAG ACT CTG TTT CGG GAG CGG AGC 144
 AAA GGC CGC ATC CAG CGC CAG CTG GAG ATA ACT GGG AGA ACC ACC ACA 160
 GAC GAC GAG CTA GAA GAG ATG CTG GAG AGC GGG AAG CCA TCC ATC TTC 176
 ACT TCC GAC ATT ATA TCA GAT TCA CAA ATT ACT AGA CAA GCT CTC AAT 192
 GAA ATC GAG TCA CGT CAC AAG GAC ATC ATG AAG CTG GAG ACC AGC ATC 208
 CGA GAG TTG CAT GAG ATG TTC ATG GAC ATG GCT ATG TTT GTG GAG ACT 224
 CAG GGT GAA ATG ATC AAC AAC ATA GAA AGA AAT GTT ATG AAT GCC ACA 240
 GAC TAT GTA GAA CAC GCT AAA GAA GAA ACA AAA AAA GCT ATC AAA TAT 256
 CAG AGC AAG GCA AGA AGG AAA AAG TGG ATA ATT ATT GCT GTG TCA GTG 272
 GTT CTG GTT GTC ATA ATC GTT CTA ATT ATT GGC TTG TCA GTT GGC AAA 288
 TGA 289

式(7)

ATG CGG GAC CGG CTG CCA GAC CTG ACG GCG TGT AGG AAG AAT GAT GAT 16
 GGA GAC ACA GTT GTT GTG GTT GAG AAA GAT CAT TTC ATG GAT GAT TTC 32
 TTC CAT CAG GTG GAG GAG ATT AGA AAC AGT ATT GAT AAA ATA ACT CAA 48
 TAT GTT GAA GAA GTA AAG AAA AAC CAC AGC ATC ATT CTT TCT GCA CCA 64

7 8
AAC CCG GAA GGA AAA ATA AAA GAA GAG CTT GAA GAT CTG AAC AAA GAA 80
ATC AAG AAA ACT GCG AAT AAA ATT CGA GCC AAG TTA AAG GCT ATT GAA 96
CAA AGT TTT GAT CAG GAT GAG AGT GGG AAC CCG ACT TCA GTG GAT CTT 112
CGG ATA CGA AGA ACC CAG CAT TCG GTG CTG TCT CCG AAG TTT GTG GAA 128
GCC ATG GCG GAG TAC AAT GAG GCA CAG ACT CTG TTT CCG GAG CCG AGC 144
AAA GGC CGC ATC CAG CGC CAG CTG GAG ATA ACT GGG AGA ACC ACC ACA 160
GAC GAC GAG CTA GAA GAG ATG CTG GAG AGC GGG AAG CCA TCC ATC TTC 176
ACT TCC GAC ATT ATA TCA GAT TCA CAA ATT ACT AGA CAA GCT CTC AAT 192
GAA ATC GAG TCA CGT CAC AAG GAC ATC ATG AAG CTG GAG ACC AGC ATC 208
CGA GAG TTG CAT GAG ATG TTC ATG GAC ATG GCT ATG TTT GTG GAG ACT 224
CAG GGT GAA ATG ATC AAC AAC ATA GAA AGA AAT GTT ATG AAT GCC ACA 240
GAC TAT GTA GAA CAC GCT AAA GAA GAA ACA AAA AAA GCT ATC AAA TAT 256
CAG AGC AAG GCA AGA AGG AAA TTG ATG TTC ATT ATT ATT TGT GTA ATT 272
GTT TTG CTT GTG ATC CTT GGA ATT ATC CTA GCA ACA ACA TTG TCA TAG 288

式(8)

ATG CCG GAC CCG CTG CCA GAC CTG ACG GCG TGT AGG AAG AAT GAT GAT 16
GGA GAC ACA GTT GTT GTG GTT GAG AAA GAT CAT TTC ATG GAT GAT TTC 32
TTC CAT CAG GTG GAG GAG ATT AGA AAC AGT ATT GAT AAA ATA ACT CAA 48
TAT GTT GAA GAA GTA AAG AAA AAC CAC AGC ATC ATT CTT TCT GCA CCA 64
AAC CCG GAA GGA AAA ATA AAA GAA GAG CTT GAA GAT CTG AAC AAA GAA 80
ATC AAG AAA ACT GCG AAT AAA ATT CGA GCC AAG TTA AAG GCT ATT GAA 96
CAA AGT TTT GAT CAG GAT GAG AGT GGG AAC CCG ACT TCA GTG GAT CTT 112
CGG ATA CGA AGA ACC CAG CAT TCG GTG CTG TCT CCG AAG TTT GTG GAA 128
GCC ATG GCG GAG TAC AAT GAG GCA CAG ACT CTG TTT CCG GAG CCG AGC 144
AAA GGC CGC ATC CAG CGC CAG CTG GAG ATA ACT GGG AGA ACC ACC ACA 160
GAC GAC GAG CTA GAA GAG ATG CTG GAG AGC GGG AAG CCA TCC ATC TTC 176
ACT TCC GAC ATT ATA TCA GAT TCA CAA ATT ACT AGA CAA GCT CTC AAT 192
GAA ATC GAG TCA CGT CAC AAG GAC ATC ATG AAG CTG GAG ACC AGC ATC 208
CGA GAG TTG CAT GAG ATG TTC ATG GAC ATG GCT ATG TTT GTG GAG ACT 224
CAG GGT GAA ATG ATC AAC AAC ATA GAA AGA AAT GTT ATG AAT GCC ACA 240
GAC TAT GTA GAA CAC GCT AAA GAA GAA ACA AAA AAA GCT ATC AAA TAT 256
CAG AGC AAG GCA AGA AGG CAA CAA CAT TGT CAT AGC AAC CAT ATC CCA 272
AGA GCC ATT TAT CCT TGA 278

【請求項9】 下記の式(9)、(10)、又は(1) 前記請求項6記載のマウスエビモルフィン。
1) のうちのいずれか1種のアミノ酸配列で表される、

式(9)

Met Arg Asp Arg Leu Pro Asp Leu Thr Ala Cys Arg Thr Asn Asp Asp
1 5 10 15
Gly Asp Thr Ala Val Val Ile Val Glu Lys Asp His Phe Met Asp Gly
20 25 30
Phe Phe His Gln Val Glu Glu Ile Arg Ser Ser Ile Ala Arg Ile Ala
35 40 45
Gln His Val Glu Asp Val Lys Lys Asn His Ser Ile Ile Leu Ser Ala
50 55 60
Pro Asn Pro Glu Gly Lys Ile Lys Glu Glu Leu Glu Asp Leu Asp Lys
65 70 75 80
Glu Ile Lys Lys Thr Ala Asn Arg Ile Arg Gly Lys Leu Lys Ser Ile
85 90 95
Glu Gln Ser Cys Asp Gln Asp Glu Asn Gly Asn Arg Thr Ser Val Asp
100 105 110

Leu Arg Ile Arg Arg Thr Gln His Ser Val Leu Ser Arg Lys Phe Val
 115 120 125
 Asp Val Met Thr Glu Tyr Asn Glu Ala Gln Ile Leu Phe Arg Glu Arg
 130 135 140
 Ser Lys Gly Arg Ile Gln Arg Gln Leu Glu Ile Thr Gly Arg Thr Thr
 145 150 155 160
 Thr Asp Asp Glu Leu Glu Glu Met Leu Glu Ser Gly Lys Pro Ser Ile
 165 170 175
 Phe Ile Ser Asp Ile Ile Ser Asp Ser Gln Ile Thr Arg Gln Ala Leu
 180 185 190
 Asn Glu Ile Glu Ser Arg His Lys Asp Ile Met Lys Leu Glu Thr Ser
 195 200 205
 Ile Arg Glu Leu His Glu Met Phe Met Asp Met Ala Met Phe Val Glu
 210 215 220
 Thr Gln Gly Glu Met Val Asn Asn Ile Glu Arg Asn Val Val Asn Ser
 225 230 235 240
 Val Asp Tyr Val Glu His Ala Lys Glu Glu Thr Lys Lys Ala Ile Lys
 245 250 255
 Tyr Gln Ser Lys Ala Arg Arg Lys Lys Trp Ile Ile Ala Ala Val Ala
 260 265 270
 Val Ala Val Ile Ala Val Leu Ala Leu Ile Ile Gly Leu ser Val Gly
 275 280 285

Lys

式(10)

Met Arg Asp Arg Leu Pro Asp Leu Thr Ala Cys Arg Thr Asn Asp Asp
 1 5 10 15
 Gly Asp Thr Ala Val Val Ile Val Glu Lys Asp His Phe Met Asp Gly
 20 25 30
 Phe Phe His Gln Val Glu Glu Ile Arg Ser Ser Ile Ala Arg Ile Ala
 35 40 45
 Gln His Val Glu Asp Val Lys Lys Asn His Ser Ile Ile Leu Ser Ala
 50 55 60
 Pro Asn Pro Glu Gly Lys Ile Lys Glu Glu Leu Glu Asp Leu Asp Lys
 65 70 75 80
 Glu Ile Lys Lys Thr Ala Asn Arg Ile Arg Gly Lys Leu Lys Ser Ile
 85 90 95
 Glu Gln Ser Cys Asp Gln Asp Glu Asn Gly Asn Arg Thr Ser Val Asp
 100 105 110
 Leu Arg Ile Arg Arg Thr Gln His Ser Val Leu Ser Arg Lys Phe Val
 115 120 125
 Asp Val Met Thr Glu Tyr Asn Glu Ala Gln Ile Leu Phe Arg Glu Arg
 130 135 140
 Ser Lys Gly Arg Ile Gln Arg Gln Leu Glu Ile Thr Gly Arg Thr Thr
 145 150 155 160
 Thr Asp Asp Glu Leu Glu Glu Met Leu Glu Ser Gly Lys Pro Ser Ile
 165 170 175
 Phe Ile Ser Asp Ile Ile Ser Asp Ser Gln Ile Thr Arg Gln Ala Leu
 180 185 190
 Asn Glu Ile Glu Ser Arg His Lys Asp Ile Met Lys Leu Glu Thr Ser
 195 200 205

(7)

特開平6-293800

11

12

Ile Arg Glu Leu His Glu Met Phe Met Asp Met Ala Met Phe Val Glu
 210 215 220
 Thr Gln Gly Glu Met Val Asn Asn Ile Glu Arg Asn Val Val Asn Ser
 225 230 235 240
 Val Asp Tyr Val Glu His Ala Lys Glu Glu Thr Lys Lys Ala Ile Lys
 245 250 255
 Tyr Gln Ser Lys Ala Arg Arg Lys Val Met Phe Val Leu Ile Cys Val
 260 265 270
 Val Thr Leu Leu Val Ile Leu Gly Ile Ile Leu Ala Thr Ala Leu Ser
 275 280 285

式(11)

Met Arg Asp Arg Leu Pro Asp Leu Thr Ala Cys Arg Thr Asn Asp Asp
 1 5 10 15
 Gly Asp Thr Ala Val Val Ile Val Glu Lys Asp His Phe Met Asp Gly
 20 25 30
 Phe Phe His Gln Val Glu Glu Ile Arg Ser Ser Ile Ala Arg Ile Ala
 35 40 45
 Gln His Val Glu Asp Val Lys Lys Asn His Ser Ile Ile Leu Ser Ala
 50 55 60
 Pro Asn Pro Glu Gly Lys Ile Lys Glu Glu Leu Glu Asp Leu Asp Lys
 65 70 75 80
 Glu Ile Lys Lys Thr Ala Asn Arg Ile Arg Gly Lys Leu Lys Ser Ile
 85 90 95
 Glu Gln Ser Cys Asp Gln Asp Glu Asn Gly Asn Arg Thr Ser Val Asp
 100 105 110
 Leu Arg Ile Arg Arg Thr Gln His Ser Val Leu Ser Arg Lys Phe Val
 115 120 125
 Asp Val Met Thr Glu Tyr Asn Glu Ala Gln Ile Leu Phe Arg Glu Arg
 130 135 140
 Ser Lys Gly Arg Ile Gln Arg Gln Leu Glu Ile Thr Gly Arg Thr Thr
 145 150 155 160
 Thr Asp Asp Glu Leu Glu Glu Met Leu Glu Ser Gly Lys Pro Ser Ile
 165 170 175
 Phe Ile Ser Asp Ile Ile Ser Asp Ser Gln Ile Thr Arg Gln Ala Leu
 180 185 190
 Asn Glu Ile Glu Ser Arg His Lys Asp Ile Met Lys Leu Glu Thr Ser
 195 200 205
 Ile Arg Glu Leu His Glu Met Phe Met Asp Met Ala Met Phe Val Glu
 210 215 220
 Thr Gln Gly Glu Met Val Asn Asn Ile Glu Arg Asn Val Val Asn Ser
 225 230 235 240
 Val Asp Tyr Val Glu His Ala Lys Glu Glu Thr Lys Lys Ala Ile Lys
 245 250 255
 Tyr Gln Ser Lys Ala Arg Arg Gln Gln His Cys His Ser Asn Arg Thr
 260 265 270
 Pro Arg Ala Leu Cys Pro Arg
 275

【請求項10】 下記の式(12)、(13)、又は
 (14)のうちのいずれか1種の塩基配列で表される、

式(12)

前記請求項9記載のマウスエビモルフィンをコードする
 遺伝子。

13

14

ATG CGG GAC CGG CTG CCC GAC CTC ACG GCG TGT AGG ACA AAC GAC GAT 16
 GGA GAC ACT GCT GTC GTC ATT GTG GAG AAG GAT CAT TTC ATG GAC GGT 32
 TTC TTC CAT CAG GTA GAG GAG ATT CGA AGC AGC ATA GCC AGG ATT GCT 48
 CAG CAT GTA GAA GAC GTG AAG AAG AAC CAC AGC ATC ATC CTG TCT GCT 64
 CCA AAC CCA GAA GGA AAA ATA AAA GAA GAG CTG GAG GAC CTG GAC AAA 80
 GAG ATC AAG AAA ACT GCT AAC AGG ATC CGG GGC AAG CTG AAG TCT ATT 96
 GAG CAG AGC TGT GAT CAG GAC GAG AAT GGG AAC CGA ACT TCA GTG GAT 112
 CTG CGG ATA CGA AGG ACC CAG CAC TCG GTG CTG TCA CGG AAG TTT GTG 128
 GAC GTC ATG ACA GAA TAC AAT GAA GCG CAG ATC CTG TTC CGG GAG CGA 144
 AGC AAA GGC CGC ATC CAG CGC CAG CTG GAG ATC ACT GGG AGG ACC ACC 160
 ACT GAC GAC GAG CTG GAA GAG ATG CTG GAG AGC GGG AAG CCG TCC ATC 176
 TTC ATC TCG GAT ATT ATA TCA GAT TCA CAA ATC ACT AGG CAA GCT CTC 192
 AAT GAG ATC GAG TCC CGC CAC AAA GAC ATC ATG AAG CTG GAG ACC AGC 208
 ATC CGA GAG CTG CAC GAG ATG TTC ATG GAT ATG GGC ATG TTT GTC GAG 224
 ACT CAG GGT GAA ATG GTC AAC AAC ATC GAG AGA AAT GTG GTG AAC TCT 240
 GTA GAT TAC GTG GAA CAT GCC AAG GAA GAG ACG AAG AAA GCC ATC AAA 256
 TAC CAG AGC AAG GCC AGG CGG AAA AAG TGG ATA ATT GCT GCT GTG GCG 272
 GTG GCT GTC ATT GCC GTC CTG GCT CTA ATC ATT GGC TTG TCG GTT GGC 288
 AAA TGA 290

式(13)

ATG CGG GAC CGG CTG CCC GAC CTC ACG GCG TGT AGG ACA AAC GAC GAT 16
 GGA GAC ACT GCT GTC GTC ATT GTG GAG AAG GAT CAT TTC ATG GAC GGT 32
 TTC TTC CAT CAG GTA GAG GAG ATT CGA AGC AGC ATA GCC AGG ATT GCT 48
 CAG CAT GTA GAA GAC GTG AAG AAG AAC CAC AGC ATC ATC CTG TCT GCT 64
 CCA AAC CCA GAA GGA AAA ATA AAA GAA GAG CTG GAG GAC CTG GAC AAA 80
 GAG ATC AAG AAA ACT GCT AAC AGG ATC CGG GGC AAG CTG AAG TCT ATT 96
 GAG CAG AGC TGT GAT CAG GAC GAG AAT GGG AAC CGA ACT TCA GTG GAT 112
 CTG CGG ATA CGA AGG ACC CAG CAC TCG GTG CTG TCA CGG AAG TTT GTG 128
 GAC GTC ATG ACA GAA TAC AAT GAA GCG CAG ATC CTG TTC CGG GAG CGA 144
 AGC AAA GGC CGC ATC CAG CGC CAG CTG GAG ATC ACT GGG AGG ACC ACC 160
 ACT GAC GAC GAG CTG GAA GAG ATG CTG GAG AGC GGG AAG CCG TCC ATC 176
 TTC ATC TCG GAT ATT ATA TCA GAT TCA CAA ATC ACT AGG CAA GCT CTC 192
 AAT GAG ATC GAG TCC CGC CAC AAA GAC ATC ATG AAG CTG GAG ACC AGC 208
 ATC CGA GAG CTG CAC GAG ATG TTC ATG GAT ATG GGC ATG TTT GTC GAG 224
 ACT CAG GGT GAA ATG GTC AAC AAC ATC GAG AGA AAT GTG GTG AAC TCT 240
 GTA GAT TAC GTG GAA CAT GCC AAG GAA GAG ACG AAG AAA GCC ATC AAA 256
 TAC CAG AGC AAG GCC AGG CGG AAG GTG ATG TTC GTC CTC ATT TGT GTA 272
 GTC ACT TTG CTT GTG ATC CTT GGA ATT ATT CTC GCA ACA GCA TTG TCA 288
 TAG 289

式(14)

ATG CGG GAC CGG CTG CCC GAC CTC ACG GCG TGT AGG ACA AAC GAC GAT 16
 GGA GAC ACT GCT GTC GTC ATT GTG GAG AAG GAT CAT TTC ATG GAC GGT 32
 TTC TTC CAT CAG GTA GAG GAG ATT CGA AGC AGC ATA GCC AGG ATT GCT 48
 CAG CAT GTA GAA GAC GTG AAG AAG AAC CAC AGC ATC ATC CTG TCT GCT 64
 CCA AAC CCA GAA GGA AAA ATA AAA GAA GAG CTG GAG GAC CTG GAC AAA 80
 GAG ATC AAG AAA ACT GCT AAC AGG ATC CGG GGC AAG CTG AAG TCT ATT 96
 GAG CAG AGC TGT GAT CAG GAC GAG AAT GGG AAC CGA ACT TCA GTG GAT 112
 CTG CGG ATA CGA AGG ACC CAG CAC TCG GTG CTG TCA CGG AAG TTT GTG 128
 GAC GTC ATG ACA GAA TAC AAT GAA GCG CAG ATC CTG TTC CGG GAG CGA 144
 AGC AAA GGC CGC ATC CAG CGC CAG CTG GAG ATC ACT GGG AGG ACC ACC 160

15

ACT GAC GAC GAG CTG GAA GAG ATG CTG GAG AGC GGG AAG CCG TCC ATC 176
 TTC ATC TCG GAT ATT ATA TCA GAT TCA CAA ATC ACT AGG CAA GCT CTC 192
 AAT GAG ATC GAG TCC CGC CAC AAA GAC ATC ATG AAG CTG GAG ACC AGC 208
 ATC CGA GAG CTG CAC GAG ATG TTC ATG GAT ATG GCC ATG TTT GTC GAG 224
 ACT CAG GGT GAA ATG GTC AAC AAC ATC GAG AGA AAT GTG GTG AAC TCT 240
 GTA GAT TAC GTG GAA CAT GCC AAG GAA GAG ACG AAG AAA GCC ATC AAA 256
 TAC CAG AGC AAG GCC AGG CGG CAA CAG CAT TGT CAT AGC AAC CGT ACC 272
 CCA AGA GCT CTT TGT CCT CGG TGA 280

16

【請求項11】 前記請求項1記載のエピモルフィンのポリペプチドのカルボキシ末端疎水性部分を、欠損もしくは非疎水性ポリペプチドに置換した、改変エピモルフィン。

【請求項12】 前記請求項7記載のヒトエピモルフィンのポリペプチドのN末端より230番目ないし263番目以降のC末端アミノ酸残基を、欠損もしくは非疎水性ポリペプチドに置換した、前記請求項11記載のヒト改変エピモルフィン。

【請求項13】 前記請求項9記載のマウスエピモルフィンのポリペプチドのN末端より231番目ないし264番目以降のC末端アミノ酸残基を、欠損もしくは非疎水性ポリペプチドに置換した、前記請求項11記載のマウス改変エピモルフィン。

【請求項14】 前記請求項1記載のエピモルフィンの完全体もしくはその一部分を、エピモルフィンが由来する動物種と異なる種の動物に免疫し、その動物の血清から得られるエピモルフィンに対するポリクローナル抗体。

【請求項15】 前記請求項1記載のエピモルフィンに対するモノクローナル抗体。

【請求項16】 前記請求項1記載のエピモルフィンの完全体もしくはその一部分を、エピモルフィンが由来する動物種と異なる種の動物に免疫し、その動物から取り出した抗体産生細胞をミエローマ細胞と融合することにより形成したハイブリドーマより得られる前記請求項15記載のエピモルフィンに対するモノクローナル抗体。

【請求項17】 前記請求項3記載のマウスエピモルフィンの完全体もしくはその一部分を、ラットに免疫し、そのラットから取り出した抗体産生細胞をミエローマ細胞と融合することにより形成したハイブリドーマより得られる、前記請求項16記載のエピモルフィンに対するモノクローナル抗体。

【請求項18】 前記請求項15記載のエピモルフィンに対するモノクローナル抗体を用いて、抗原抗体反応を利用した免疫学的精製方法で、エピモルフィンを精製することを特徴とするエピモルフィンの精製法。

【請求項19】 前記請求項14又は15記載のエピモルフィンに対するポリクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体を用いて、抗原抗体反応を利用した免疫学的測定方法で、エピモルフィンを検出することを特徴とするエピモルフィンの検出法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、少なくともマウスからヒトに至る哺乳動物の皮膚、肺、腸等の間充織組織に広く存在し、上皮組織の形態形成に必要な生理活性物質（本発明者らは、これをエピモルフィンと命名した）に関するものであり、更に詳しくは、当該生理活性物質エピモルフィン、エピモルフィンの改変体、エピモルフィンをコードする遺伝子、エピモルフィンに対するポリクローナル抗体とモノクローナル抗体、及び当該抗体を利用したエピモルフィンの精製、検出法に関するものである。本発明は、上皮形態の異常に起因する疾患の発症機序の解明、ならびにそれらの疾患の診断法、治療法の開発、あるいは新たな創傷治療法の開発等に有用な手段を提供するものである。

【0002】

【従来の技術】 上皮の正常な組織化、形態形成は、間充織のなんらかの制御を受けていることから、また、上皮形態の異常に起因する疾患の多くは、そのまわりに存在する間充織が原因となることから、古くから、間充織が上皮の形態形成を支持するメカニズムについての研究がなされている。しかしながら、実際に、上皮の形態形成を制御する分子の単離、精製及びその構造解析についての研究は、研究対象が複雑な系の中で時間的、空間的な制御を受けて発現する物質のために、単純化された培養系での実験が難しく、未だ大きな進展は見られていない。

【0003】 上皮形態の異常に起因する疾患の発症機序の解明、ならびにそれらの疾患の診断法、治療法の開発等を実現するためには、間充織細胞が作る上記のような上皮形態を制御する作用を有する分子、すなわち当該作用を有する生理活性物質の単離、精製及びその構造の解明等が、不可欠の前提であり、当該生理活性物質の単離、精製及び当該物質の構造の解明等を早期に達成する事が、当該分野における重要課題となっていた。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 そこで、本発明者らは、このような課題を解決することを目指して、まず、形態形成の盛んに行われている実験動物マウスの胎児皮膚組織を用いて、生体内と同様な形態形成が行われる生体外培養実験系を確立した。この技術の特徴は、

50 生体から取り出した細胞を上皮細胞と間充織細胞に分離

した後、従来であれば間充細胞の単層培養を行ってその生成物を調べる方法がとられていたのに対し、分離された間充細胞を集塊状にして培養する点にある。

【0005】本発明者らは、この培養方法を用いてマウス胎児皮膚から分離した上皮が集塊状の間充細胞と接触した時にのみ生体外でも正常な形態形成を行うことを見出した。そこで、この集塊状の間充細胞が作り出す、上皮の形態形成を支持する物質を調べるため、集塊状で培養した間充細胞を免疫原としてラットに免疫し、得られたマウス間充細胞に対するラットのモノクローナル抗体のうちから、マウス間充細胞に結合することにより上皮の形態形成を阻害する作用を有する抗体を選び出した。

【0006】次に、本発明者らは、この抗体を用いて、この抗体が結合する物質、すなわち間充細胞成分中に存在し上皮の形態形成を支持する新規な物質を探索した結果、目的とする前記作用を有する新規生理活性物質を見出し、更に、その物質（マウスエビモルフィン）を単離し、当該物質の構造、すなわちその遺伝子配列とアミノ酸配列を明らかにすることに始めて成功した。更に、本発明者らは、得られた遺伝子を用いて、マウスエビモルフィンの他のアイソフォーム2種、及び、それぞれに対応するヒトエビモルフィンとそのアイソフォーム2種を同定することに成功した。

【0007】更に、上記で得られた遺伝子を適当な発現ベクターに組み込んだ後、動物細胞もしくは大腸菌に導入して発現させることにより、エビモルフィンを人工的に作ることが可能になった。これらの生成物は、いずれも、上皮とエビモルフィンを作ることのできない間充細胞株の組合せ培養実験に加えることにより、正常な上皮の形態形成を行わせる作用を有するものであることが分かった。すなわち、本発明者らは、その生成物の解析から、エビモルフィンを作る能力をほとんど失っていることが明らかな間充細胞株と胎児の上皮組織の組合せ培養では、上皮の正常な形態形成が見られないという事実と、この間充細胞株にエビモルフィン遺伝子を導入して強制発現させるか、あるいは、この培養実験の培養液中にエビモルフィンを加えることにより、正常な上皮の形態形成が行われるようになるという事実から、当該生成物が、前記上皮の形態形成作用を有するものであることを確認した。

【0008】また、ポリペプチドのカルボキシ末端に疎水性のアミノ酸配列を持つ細胞膜結合型のエビモルフィンについては、細胞膜結合部分である疎水性蛋白質部分を含むカルボキシ末端から、5分の1程度までのポリペプチドを取り除くか、あるいは、非疎水性ポリペプチドに置換することにより、可溶性の、すなわち、培養動物細胞から培養液中に分泌され、かつ精製分離の容易な形態の、改変エビモルフィンを作ることに成功した。これらの改変エビモルフィンは、アイソフォームを含めた3

種に共通するアミノ酸配列で構成されており、得られた改変エビモルフィンは、高い可溶性を有し、かつ天然のエビモルフィンと同様に、正常な上皮の形態形成を行わせる作用を有するものであることが分かった。

【0009】更に、本発明者らは、上記方法で得られたエビモルフィンの完全体もしくはその一部分を用いて、当該エビモルフィンが由来する動物種と異なるウサギ、ラット、マウス等の動物に免疫し、前記エビモルフィンに特に強く結合する作用を有するポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体を得ることに成功した。

【0010】このような結果として、本発明者らは、上皮の形態形成作用を有し、上皮の形態形成に必要な分子である新規生理活性物質エビモルフィン、及び当該エビモルフィンをコードする遺伝子を同定し、更に、遺伝子組換え技術を利用して、当該遺伝子を動物細胞もしくは大腸菌に導入して発現させることにより前記エビモルフィンを製造し、また、当該エビモルフィンと同等の作用を有し、かつ高い可溶性を有する改変エビモルフィンを製造する技術を確認した。そして、これらの物質を用いて、当該エビモルフィンに特に強く結合する作用を有し、当該エビモルフィンの発現調査や精製に利用し得るポリクローナル抗体とモノクローナル抗体の製造を完成し、更に、これらの物質が、上皮形態の異常に起因する疾患の発症機序の解明、ならびにそれらの疾患の診断法、治療法の開発、あるいは新たな創傷治癒法の開発等に有用な材料であることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0011】すなわち、本発明の目的は、少なくともマウスからヒトに至る哺乳動物の皮膚、肺、腸等の間充細胞に存在し、下記の式(1)の塩基配列と相補的な塩基配列で構成される遺伝子プローブとハイブリダイズする遺伝子によって発現され得る新規生理活性物質エビモルフィンを提供することである。

式(1)

ATG CGG GAC CGG CTG CCA GAC CTG ACG GCG TGT AGG

【0012】また、本発明の目的は、アミノ末端のアミノ酸残基の構造が、下記の式(2)のとおりである前記の新規生理活性物質エビモルフィンを提供することである。

式(2)

Met Arg Asp Arg Leu Pro Asp Leu Thr Ala Cys

【0013】また、本発明の目的は、ヒト由来の間充細胞が作る、後記式(3)、(4)、又は(5)のアミノ酸配列で表される上皮の形態形成に必要な新規生理活性物質ヒトエビモルフィン、及び当該ヒトエビモルフィンのアイソフォームを提供することである。ここで、後記の、式(3)は、ヒトエビモルフィンのアミノ酸配列を、式(4)は、別のヒトエビモルフィン(アイソフォームA)のアミノ酸配列を、そして、式(5)は、別のヒトエビモルフィン(アイソフォームB)のアミノ酸配

列を、それぞれ、示す。

【0014】また、本発明の目的は、前記ヒトエビモルフィン、及び当該ヒトエビモルフィンのアイソフォームをコードする、後記式(6)、(7)、又は(8)の塩基配列で表される遺伝子を提供することである。ここで、後記の、式(6)は、ヒトエビモルフィンをコードする遺伝子の塩基配列を、式(7)は、別のヒトエビモルフィン(アイソフォームA)をコードする遺伝子の塩基配列を、そして、式(8)は、別のヒトエビモルフィン(アイソフォームB)をコードする遺伝子の塩基配列を、それぞれ、示す。

【0015】また、本発明の目的は、マウス由来の間充細胞が作る、後記式(9)、(10)、又は(11)のアミノ酸配列で表される上皮の形態形成に必須な新規生理活性物質マウスエビモルフィン、及び当該マウスエビモルフィンのアイソフォームを提供することである。ここで、後記の、式(9)は、マウスエビモルフィンのアミノ酸配列を、式(10)は、別のマウスエビモルフィン(アイソフォームA)のアミノ酸配列を、そして、式(11)は、別のマウスエビモルフィン(アイソフォームB)のアミノ酸配列を、それぞれ、示す。

【0016】また、本発明の目的は、前記マウスエビモルフィン、及び当該マウスエビモルフィンのアイソフォームをコードする、後記式(12)、(13)、又は(14)の塩基配列で表される遺伝子を提供することである。ここで、後記の、式(12)は、マウスエビモルフィンをコードする遺伝子の塩基配列を、式(13)は、別のマウスエビモルフィン(アイソフォームA)をコードする遺伝子の塩基配列を、そして、式(14)は、別のマウスエビモルフィン(アイソフォームB)をコードする遺伝子の塩基配列を、それぞれ、示す。

【0017】また、本発明の目的は、前記エビモルフィンのポリペプチドのカルボキシ末端疎水性部分を、欠損もしくは非疎水性ポリペプチドに置換した、改変エビモルフィンを提供することである。

【0018】また、本発明の目的は、前記ヒトエビモルフィン、及び当該ヒトエビモルフィンのアイソフォームのカルボキシ末端の疎水性アミノ酸配列を含む部分を取り除くか、もしくは非疎水性ポリペプチドに置換することにより改変した、可溶性の、改変ヒトエビモルフィン、及び当該改変ヒトエビモルフィンのアイソフォームを提供することである。

【0019】また、本発明の目的は、前記マウスエビモルフィン、及び当該マウスエビモルフィンのアイソフォームのカルボキシ末端の疎水性アミノ酸配列を含む部分を取り除くか、もしくは非疎水性ポリペプチドに置換することにより改変した、可溶性の、改変マウスエビモルフィン、及び当該改変マウスエビモルフィンのアイソフォームを提供することである。

【0020】また、本発明の目的は、前記エビモルフィ

ンの完全体もしくはその一部を、エビモルフィンが由来する動物種と異なる種の動物に免疫し、その動物の血清から得られるエビモルフィンに対するポリクローナル抗体を提供することである。

【0021】また、本発明の目的は、前記エビモルフィンに対するモノクローナル抗体を提供することである。

【0022】また、本発明の目的は、前記エビモルフィンの完全体もしくはその一部を、エビモルフィンが由来する動物種と異なる種の動物に免疫し、その動物から取り出した抗体産生細胞をミエローマ細胞と融合することにより形成したハイブリドーマより得られるエビモルフィンに対するモノクローナル抗体を提供することである。

【0023】また、本発明の目的は、前記マウスモルフィンの完全体もしくはその一部を、ラットに免疫し、そのラットから取り出した抗体産生細胞を、ミエローマ細胞と融合することにより形成したハイブリドーマより得られるエビモルフィンに対するモノクローナル抗体を提供することである。

【0024】また、本発明の目的は、前記エビモルフィンに対するモノクローナル抗体を用いて、抗原抗体反応を利用した免疫学的精製方法で、各エビモルフィン及び各エビモルフィンのアイソフォームを精製する方法を提供することである。

【0025】また、本発明の目的は、前記エビモルフィンに対するポリクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体を用いて、抗原抗体反応を利用した免疫学的測定方法で、各エビモルフィン及び各エビモルフィンのアイソフォームを検出する方法を提供することである。

【0026】更に、本発明の目的は、上皮の形態形成に必須な新規生理活性物質である前記エビモルフィン及びエビモルフィンのアイソフォーム(アイソフォームA、及びアイソフォームB)、前記エビモルフィンの改変体及びエビモルフィンのアイソフォームの改変体、前記エビモルフィン及びエビモルフィンのアイソフォームに特に強く結合するポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体等、上皮形態の異常に起因する疾患の発症機序の解明、ならびにそれらの疾患の診断法、治療法の開発、あるいは新たな創傷治療法の開発等に有用な材料を提供することである。

【0027】

【課題を解決するための手段】以下に、本発明の前記エビモルフィンのアミノ酸配列、及び当該エビモルフィンをコードする遺伝子の塩基配列の具体的な配列構造を示す。なお、下記の式(3)～(14)は、特許請求の範囲の請求項7～10の式(3)～(14)に、それぞれ、対応するものである。

【0028】以下の式(3)は、ヒトエビモルフィンのアミノ酸配列を示す。

式(3)

Met Arg Asp Arg Leu Pro Asp Leu Thr Ala Cys Arg Lys Asn Asp Asp
5 10 15
Gly Asp Thr Val Val Val Val Glu Lys Asp His Phe Met Asp Asp Phe
20 25 30
Phe His Gln Val Glu Glu Ile Arg Asn Ser Ile Asp Lys Ile Thr Gln
35 40 45
Tyr Val Glu Glu Val Lys Lys Asn His Ser Ile Ile Leu Ser Ala Pro
50 55 60
Asn Pro Glu Gly Lys Ile Lys Glu Glu Leu Glu Asp Leu Asn Lys Glu
65 70 75 80
Ile Lys Lys Thr Ala Asn Lys Ile Arg Ala Lys Leu Lys Ala Ile Glu
85 90 95
Gln Ser Phe Asp Gln Asp Glu Ser Gly Asn Arg Thr Ser Val Asp Leu
100 105 110
Arg Ile Arg Arg Thr Gln His Ser Val Leu Ser Arg Lys Phe Val Glu
115 120 125
Ala Met Ala Glu Tyr Asn Glu Ala Gln Thr Leu Phe Arg Glu Arg Ser
130 135 140
Lys Gly Arg Ile Gln Arg Gln Leu Glu Ile Thr Gly Arg Thr Thr Thr
145 150 155 160
Asp Asp Glu Leu Glu Glu Met Leu Glu Ser Gly Lys Pro Ser Ile Phe
165 170 175
Thr Ser Asp Ile Ile Ser Asp Ser Gln Ile Thr Arg Gln Ala Leu Asn
180 185 190
Glu Ile Glu Ser Arg His Lys Asp Ile Met Lys Leu Glu Thr Ser Ile
195 200 205
Arg Glu Leu His Glu Met Phe Met Asp Met Ala Met Phe Val Glu Thr
210 215 220
Gln Gly Glu Met Ile Asn Asn Ile Glu Arg Asn Val Met Asn Ala Thr
225 230 235 240
Asp Tyr Val Glu His Ala Lys Glu Glu Thr Lys Lys Ala Ile Lys Tyr
245 250 255
Gln Ser Lys Ala Arg Arg Lys Lys Trp Ile Ile Ile Ala Val Ser Val
260 265 270
Val Leu Val Val Ile Ile Val Leu Ile Ile Gly Leu Ser Val Gly Lys
275 280 285

【0029】以下の式(4)は、別のヒトエビモルフィン(アイソフォームA)のアミノ酸配列を示す。

式(4)

Met Arg Asp Arg Leu Pro Asp Leu Thr Ala Cys Arg Lys Asn Asp Asp
5 10 15
Gly Asp Thr Val Val Val Val Glu Lys Asp His Phe Met Asp Asp Phe
20 25 30
Phe His Gln Val Glu Glu Ile Arg Asn Ser Ile Asp Lys Ile Thr Gln
35 40 45
Tyr Val Glu Glu Val Lys Lys Asn His Ser Ile Ile Leu Ser Ala Pro
50 55 60
Asn Pro Glu Gly Lys Ile Lys Glu Glu Leu Glu Asp Leu Asn Lys Glu
65 70 75 80
Ile Lys Lys Thr Ala Asn Lys Ile Arg Ala Lys Leu Lys Ala Ile Glu

(13)

特開平6-293800

23 24

85 90 95

Gln Ser Phe Asp Gln Asp Glu Ser Gly Asn Arg Thr Ser Val Asp Leu
100 105 110

Arg Ile Arg Arg Thr Gln His Ser Val Leu Ser Arg Lys Phe Val Glu
115 120 125

Ala Met Ala Glu Tyr Asn Glu Ala Gln Thr Leu Phe Arg Glu Arg Ser
130 135 140

Lys Gly Arg Ile Gln Arg Gln Leu Glu Ile Thr Gly Arg Thr Thr Thr
145 150 155 160

Asp Asp Glu Leu Glu Glu Met Leu Glu Ser Gly Lys Pro Ser Ile Phe
165 170 175

Thr Ser Asp Ile Ile Ser Asp Ser Gln Ile Thr Arg Gln Ala Leu Asn
180 185 190

Glu Ile Glu Ser Arg His Lys Asp Ile Met Lys Leu Glu Thr Ser Ile
195 200 205

Arg Glu Leu His Glu Met Phe Met Asp Met Ala Met Phe Val Glu Thr
210 215 220

Gln Gly Glu Met Ile Asn Asn Ile Glu Arg Asn Val Met Asn Ala Thr
225 230 235 240

Asp Tyr Val Glu His Ala Lys Glu Glu Thr Lys Lys Ala Ile Lys Tyr
245 250 255

Gln Ser Lys Ala Arg Arg Lys Leu Met Phe Ile Ile Ile Cys Val Ile
260 265 270

Val Leu Leu Val Ile Leu Gly Ile Ile Leu Ala Thr Thr Leu Ser
275 280 285

【0030】以下の式(5)は、また別のヒトエビモル フィン(アイソフォームB)のアミノ酸配列を示す。

式(5)

Met Arg Asp Arg Leu Pro Asp Leu Thr Ala Cys Arg Lys Asn Asp Asp
5 10 15

Gly Asp Thr Val Val Val Val Glu Lys Asp His Phe Met Asp Asp Phe
20 25 30

Phe His Gln Val Glu Glu Ile Arg Asn Ser Ile Asp Lys Ile Thr Gln
35 40 45

Tyr Val Glu Glu Val Lys Lys Asn His Ser Ile Ile Leu Ser Ala Pro
50 55 60

Asn Pro Glu Gly Lys Ile Lys Glu Glu Leu Glu Asp Leu Asn Lys Glu
65 70 75 80

Ile Lys Lys Thr Ala Asn Lys Ile Arg Ala Lys Leu Lys Ala Ile Glu
85 90 95

Gln Ser Phe Asp Gln Asp Glu Ser Gly Asn Arg Thr Ser Val Asp Leu
100 105 110

Arg Ile Arg Arg Thr Gln His Ser Val Leu Ser Arg Lys Phe Val Glu
115 120 125

Ala Met Ala Glu Tyr Asn Glu Ala Gln Thr Leu Phe Arg Glu Arg Ser
130 135 140

Lys Gly Arg Ile Gln Arg Gln Leu Glu Ile Thr Gly Arg Thr Thr Thr
145 150 155 160

Asp Asp Glu Leu Glu Glu Met Leu Glu Ser Gly Lys Pro Ser Ile Phe
165 170 175

Thr Ser Asp Ile Ile Ser Asp Ser Gln Ile Thr Arg Gln Ala Leu Asn

(14)

特開平6-293800

25 180 185 190 25

Glu Ile Glu Ser Arg His Lys Asp Ile Met Lys Leu Glu Thr Ser Ile
195 200 205

Arg Glu Leu His Glu Met Phe Met Asp Met Ala Met Phe Val Glu Thr
210 215 220

Gln Gly Glu Met Ile Asn Asn Ile Glu Arg Asn Val Met Asn Ala Thr
225 230 235 240

Asp Tyr Val Glu His Ala Lys Glu Glu Thr Lys Lys Ala Ile Lys Tyr
245 250 255

Gln Ser Lys Ala Arg Arg Gln Gln His Cys His Ser Asn His Ile Pro
260 265 270

Arg Ala Ile Tyr Pro
275

【0031】以下の式(6)は、ヒトエビモルフィンを* *コードする遺伝子の配列を示す。

式(6)

ATG CGG GAC CGG CTG CCA GAC CTG ACG GCG TGT AGG AAG AAT GAT GAT 16
GGA GAC ACA GTT GTT GTG GTT GAG AAA GAT CAT TTC ATG GAT GAT TTC 32
TTC CAT CAG GTG GAG GAG ATT AGA AAC AGT ATT GAT AAA ATA ACT CAA 48
TAT GTT GAA GAA GTA AAG AAA AAC CAC AGC ATC ATT CTT TCT GCA CCA 64
AAC CCG GAA GGA AAA ATA AAA GAA GAG CTT GAA GAT CTG AAC AAA GAA 80
ATC AAG AAA ACT GCG AAT AAA ATT CGA GGC AAG TTA AAG GCT ATT GAA 96
CAA AGT TTT GAT CAG GAT GAG AGT GGG AAC CGG ACT TCA GTG GAT CTT 112
CGG ATA CGA AGA ACC CAG CAT TCG GTG CTG TCT CGG AAG TTT GTG GAA 128
GCC ATG GCG GAG TAC AAT GAG GCA CAG ACT CTG TTT CGG GAG CGG AGC 144
AAA GGC CGC ATC CAG CGC CAG CTG GAG ATA ACT GGG AGA ACC ACC ACA 160
GAC GAC GAG CTA GAA GAG ATG CTG GAG AGC GGG AAG CCA TCC ATC TTC 176
ACT TCC GAC ATT ATA TCA GAT TCA CAA ATT ACT AGA CAA GCT CTC AAT 192
GAA ATC GAG TCA CGT CAC AAG GAC ATC ATG AAG CTG GAG ACC AGC ATC 208
CGA GAG TTG CAT GAG ATG TTC ATG GAC ATG GCT ATG TTT GTG GAG ACT 224
CAG GGT GAA ATG ATC AAC AAC ATA GAA AGA AAT GTT ATG AAT GCC ACA 240
GAC TAT GTA GAA CAC GCT AAA GAA GAA ACA AAA AAA GCT ATC AAA TAT 256
CAG AGC AAG GCA AGA AGG AAA AAG TGG ATA ATT ATT GCT GTG TCA GTG 272
GTT CTG GTT GTC ATA ATC GTT CTA ATT ATT GGC TTG TCA GTT GGC AAA 288
TGA 289

【0032】以下の式(7)は、別のヒトエビモルフィ

ン(アイソフォームA)をコードする遺伝子の配列を示

式(7)

ATG CGG GAC CGG CTG CCA GAC CTG ACG GCG TGT AGG AAG AAT GAT GAT 16
GGA GAC ACA GTT GTT GTG GTT GAG AAA GAT CAT TTC ATG GAT GAT TTC 32
TTC CAT CAG GTG GAG GAG ATT AGA AAC AGT ATT GAT AAA ATA ACT CAA 48
TAT GTT GAA GAA GTA AAG AAA AAC CAC AGC ATC ATT CTT TCT GCA CCA 64
AAC CCG GAA GGA AAA ATA AAA GAA GAG CTT GAA GAT CTG AAC AAA GAA 80
ATC AAG AAA ACT GCG AAT AAA ATT CGA GGC AAG TTA AAG GCT ATT GAA 96
CAA AGT TTT GAT CAG GAT GAG AGT GGG AAC CGG ACT TCA GTG GAT CTT 112
CGG ATA CGA AGA ACC CAG CAT TCG GTG CTG TCT CGG AAG TTT GTG GAA 128
GCC ATG GCG GAG TAC AAT GAG GCA CAG ACT CTG TTT CGG GAG CGG AGC 144
AAA GGC CGC ATC CAG CGC CAG CTG GAG ATA ACT GGG AGA ACC ACC ACA 160
GAC GAC GAG CTA GAA GAG ATG CTG GAG AGC GGG AAG CCA TCC ATC TTC 176
ACT TCC GAC ATT ATA TCA GAT TCA CAA ATT ACT AGA CAA GCT CTC AAT 192
GAA ATC GAG TCA CGT CAC AAG GAC ATC ATG AAG CTG GAG ACC AGC ATC 208

27
CGA GAG TTG CAT GAG ATG TTC ATG GAC ATG GCT ATG TTT GTG GAG ACT 224
CAG GGT GAA ATG ATC AAC AAC ATA GAA AGA AAT GTT ATG AAT GCC ACA 240
GAC TAT GTA GAA CAC GCT AAA GAA GAA ACA AAA AAA GCT ATC AAA TAT 256
CAG AGC AAG GCA AGA AGG AAA TTG ATG TTC ATT ATT ATT TGT GTA ATT 272
GTT TTG CTT GTG ATC CTT GGA ATT ATC CTA GCA ACA ACA TTG TCA TAG 288

【0033】以下の式(8)は、また別のヒトエビモル *を示す。

フィン (アイソフォームB) をコードする遺伝子の配列*

式(8)

ATG CGG GAC CGG CTG CCA GAC CTG ACG GCG TGT AGG AAG AAT GAT GAT 16
GGA GAC ACA GTT GTT GTG GTT GAG AAA GAT CAT TTC ATG GAT GAT TTC 32
TTC CAT CAG GTG GAG GAG ATT AGA AAC AGT ATT GAT AAA ATA ACT CAA 48
TAT GTT GAA GAA GTA AAG AAA AAC CAC AGC ATC ATT CTT TCT GCA CCA 64
AAC CCG GAA GGA AAA ATA AAA GAA GAG CTT GAA GAT CTG AAC AAA GAA 80
ATC AAG AAA ACT GCG AAT AAA ATT CGA GCC AAG TTA AAG GCT ATT GAA 96
CAA AGT TTT GAT CAG GAT GAG AGT GGG AAC CGG ACT TCA GTG GAT CTT 112
CGG ATA CGA AGA ACC CAG CAT TCG GTG CTG TCT CGG AAG TTT GTG GAA 128
GCC ATG GCG GAG TAC AAT GAG GCA CAG ACT CTG TTT CGG GAG CGG AGC 144
AAA GGC CGC ATC CAG CGC CAG CTG GAG ATA ACT GGG AGA ACC ACC ACA 160
GAC GAC GAG CTA GAA GAG ATG CTG GAG AGC GGG AAG CCA TCC ATC TTC 176
ACT TCC GAC ATT ATA TCA GAT TCA CAA ATT ACT AGA CAA GCT CTC AAT 192
GAA ATC GAG TCA CGT CAC AAG GAC ATC ATG AAG CTG GAG ACC AGC ATC 208
CGA GAG TTG CAT GAG ATG TTC ATG GAC ATG GCT ATG TTT GTG GAG ACT 224
CAG GGT GAA ATG ATC AAC AAC ATA GAA AGA AAT GTT ATG AAT GCC ACA 240
GAC TAT GTA GAA CAC GCT AAA GAA GAA ACA AAA AAA GCT ATC AAA TAT 256
CAG AGC AAG GCA AGA AGG CAA CAA CAT TGT CAT AGC AAC CAT ATC CCA 272
AGA GCC ATT TAT CCT TGA 278

【0034】以下の式(9)は、マウスエビモルフィンの アミノ酸配列を示す。

式(9)

Met Arg Asp Arg Leu Pro Asp Leu Thr Ala Cys Arg Thr Asn Asp Asp
1 5 10 15
Gly Asp Thr Ala Val Val Ile Val Glu Lys Asp His Phe Met Asp Gly
20 25 30
Phe Phe His Gln Val Glu Glu Ile Arg Ser Ser Ile Ala Arg Ile Ala
35 40 45
Gln His Val Glu Asp Val Lys Lys Asn His Ser Ile Ile Leu Ser Ala
50 55 60
Pro Asn Pro Glu Gly Lys Ile Lys Glu Glu Leu Glu Asp Leu Asp Lys
65 70 75 80
Glu Ile Lys Lys Thr Ala Asn Arg Ile Arg Gly Lys Leu Lys Ser Ile
85 90 95
Glu Gln Ser Cys Asp Gln Asp Glu Asn Gly Asn Arg Thr Ser Val Asp
100 105 110
Leu Arg Ile Arg Arg Thr Gln His Ser Val Leu Ser Arg Lys Phe Val
115 120 125
Asp Val Met Thr Glu Tyr Asn Glu Ala Gln Ile Leu Phe Arg Glu Arg
130 135 140
Ser Lys Gly Arg Ile Gln Arg Gln Leu Glu Ile Thr Gly Arg Thr Thr
145 150 155 160
Thr Asp Asp Glu Leu Glu Glu Met Leu Glu Ser Gly Lys Pro Ser Ile
165 170 175

29

30

Phe Ile Ser Asp Ile Ile Ser Asp Ser Gln Ile Thr Arg Gln Ala Leu
 180 185 190
 Asn Glu Ile Glu Ser Arg His Lys Asp Ile Met Lys Leu Glu Thr Ser
 195 200 205
 Ile Arg Glu Leu His Glu Met Phe Met Asp Met Ala Met Phe Val Glu
 210 215 220
 Thr Gln Gly Glu Met Val Asn Asn Ile Glu Arg Asn Val Val Asn Ser
 225 230 235 240
 Val Asp Tyr Val Glu His Ala Lys Glu Glu Thr Lys Lys Ala Ile Lys
 245 250 255
 Tyr Gln Ser Lys Ala Arg Arg Lys Lys Trp Ile Ile Ala Ala Val Ala
 260 265 270
 Val Ala Val Ile Ala Val Leu Ala Leu Ile Ile Gly Leu ser Val Gly
 275 280 285
 Lys

【0035】以下の式(10)は、別のマウスエビモル フィン(アイソフォームA)のアミノ酸配列を示す。

式(10)

Met Arg Asp Arg Leu Pro Asp Leu Thr Ala Cys Arg Thr Asn Asp Asp
 1 5 10 15
 Gly Asp Thr Ala Val Val Ile Val Glu Lys Asp His Phe Met Asp Gly
 20 25 30
 Phe Phe His Gln Val Glu Glu Ile Arg Ser Ser Ile Ala Arg Ile Ala
 35 40 45
 Gln His Val Glu Asp Val Lys Lys Asn His Ser Ile Ile Leu Ser Ala
 50 55 60
 Pro Asn Pro Glu Gly Lys Ile Lys Glu Glu Leu Glu Asp Leu Asp Lys
 65 70 75 80
 Glu Ile Lys Lys Thr Ala Asn Arg Ile Arg Gly Lys Leu Lys Ser Ile
 85 90 95
 Glu Gln Ser Cys Asp Gln Asp Glu Asn Gly Asn Arg Thr Ser Val Asp
 100 105 110
 Leu Arg Ile Arg Arg Thr Gln His Ser Val Leu Ser Arg Lys Phe Val
 115 120 125
 Asp Val Met Thr Glu Tyr Asn Glu Ala Gln Ile Leu Phe Arg Glu Arg
 130 135 140
 Ser Lys Gly Arg Ile Gln Arg Gln Leu Glu Ile Thr Gly Arg Thr Thr
 145 150 155 160
 Thr Asp Asp Gln Leu Glu Glu Met Leu Glu Ser Gly Lys Pro Ser Ile
 165 170 175
 Phe Ile Ser Asp Ile Ile Ser Asp Ser Gln Ile Thr Arg Gln Ala Leu
 180 185 190
 Asn Glu Ile Glu Ser Arg His Lys Asp Ile Met Lys Leu Glu Thr Ser
 195 200 205
 Ile Arg Glu Leu His Glu Met Phe Met Asp Met Ala Met Phe Val Glu
 210 215 220
 Thr Gln Gly Glu Met Val Asn Asn Ile Glu Arg Asn Val Val Asn Ser
 225 230 235 240
 Val Asp Tyr Val Glu His Ala Lys Glu Glu Thr Lys Lys Ala Ile Lys
 245 250 255
 Tyr Gln Ser Lys Ala Arg Arg Lys Val Met Phe Val Leu Ile Cys Val

(17)

特開平6-293800

31

32

260 265 270
Val Thr Leu Leu Val Ile Leu Gly Ile Ile Leu Ala Thr Ala Leu Ser
275 280 285

【0036】以下の式(11)は、また別のマウスエビ *す。
モルフィン(アイソフォームB)のアミノ酸配列を示*

式(11)

Met Arg Asp Arg Leu Pro Asp Leu Thr Ala Cys Arg Thr Asn Asp Asp
1 5 10 15
Gly Asp Thr Ala Val Val Ile Val Glu Lys Asp His Phe Met Asp Gly
20 25 30
Phe Phe His Gln Val Glu Glu Ile Arg Ser Ser Ile Ala Arg Ile Ala
35 40 45
Gln His Val Glu Asp Val Lys Lys Asn His Ser Ile Ile Leu Ser Ala
50 55 60
Pro Asn Pro Glu Gly Lys Ile Lys Glu Glu Leu Glu Asp Leu Asp Lys
65 70 75 80
Glu Ile Lys Lys Thr Ala Asn Arg Ile Arg Gly Lys Leu Lys Ser Ile
85 90 95
Glu Gln Ser Cys Asp Gln Asp Glu Asn Gly Asn Arg Thr Ser Val Asp
100 105 110
Leu Arg Ile Arg Arg Thr Gln His Ser Val Leu Ser Arg Lys Phe Val
115 120 125
Asp Val Met Thr Glu Tyr Asn Glu Ala Gln Ile Leu Phe Arg Glu Arg
130 135 140
Ser Lys Gly Arg Ile Gln Arg Gln Leu Glu Ile Thr Gly Arg Thr Thr
145 150 155 160
Thr Asp Asp Glu Leu Glu Glu Met Leu Glu Ser Gly Lys Pro Ser Ile
165 170 175
Phe Ile Ser Asp Ile Ile Ser Asp Ser Gln Ile Thr Arg Gln Ala Leu
180 185 190
Asn Glu Ile Glu Ser Arg His Lys Asp Ile Met Lys Leu Glu Thr Ser
195 200 205
Ile Arg Glu Leu His Glu Met Phe Met Asp Met Ala Met Phe Val Glu
210 215 220
Thr Gln Gly Glu Met Val Asn Asn Ile Glu Arg Asn Val Val Asn Ser
225 230 235 240
Val Asp Tyr Val Glu His Ala Lys Glu Glu Thr Lys Lys Ala Ile Lys
245 250 255
Tyr Gln Ser Lys Ala Arg Arg Gln Gln His Cys His Ser Asn Arg Thr
260 265 270
Pro Arg Ala Leu Cys Pro Arg
275

【0037】以下の式(12)は、マウスエビモルフィンをコードする遺伝子の配列を示す。

式(12)

ATG CGG GAC CGG CTG CCC GAC CTC ACG GCG TGT AGG ACA AAC GAC GAT 16
GGA GAC ACT GCT GTC GTC ATT GTG GAG AAG GAT CAT TTC ATG GAC GGT 32
TTC TTC CAT CAG GTA GAG GAG ATT CGA AGC AGC ATA GCC AGG ATT GCT 48
CAG CAT GTA GAA GAC GTG AAG AAG AAC CAC AGC ATC ATC CTG TCT GCT 64
CCA AAC CCA GAA GGA AAA ATA AAA GAA GAG CTG GAG GAC CTG GAC AAA 80
GAG ATC AAG AAA ACT GCT AAC AGG ATC CGG GGC AAG CTG AAG TCT ATT 96

33

34

GAG CAG AGC TGT GAT CAG GAC GAG AAT GGG AAC CGA ACT TCA GTG GAT 112
 CTG CGG ATA CGA AGG ACC CAG CAC TCG GTG CTG TCA CGG AAG TTT GTG 128
 GAC GTC ATG ACA GAA TAC AAT GAA GCG CAG ATC CTG TTC CGG GAG CGA 144
 AGC AAA GGC CGC ATC CAG CGC CAG CTG GAG ATC ACT GGG AGG ACC ACC 160
 ACT GAC GAC GAG CTG GAA GAG ATG CTG GAG AGC GGG AAG CCG TCC ATC 176
 TTC ATC TCG GAT ATT ATA TCA GAT TCA CAA ATC ACT AGG CAA GCT CTC 192
 AAT GAG ATC GAG TCC CGC CAC AAA GAC ATC ATG AAG CTG GAG ACC AGC 208
 ATC CGA GAG CTG CAC GAG ATG TTC ATG GAT ATG GCC ATG TTT GTC GAG 224
 ACT CAG GGT GAA ATG GTC AAC AAC ATC GAG AGA AAT GTG GTG AAC TCT 240
 GTA GAT TAC GTG GAA CAT GCC AAG GAA GAG ACG AAG AAA GCC ATC AAA 256
 TAC CAG AGC AAG GCC AGG CGG AAA AAG TGG ATA ATT GCT GCT GTG GCG 272
 GTG GCT GTC ATT GCC GTC CTG GCT CTA ATC ATT GGC TTG TCG GTT GGC 288
 AAA TGA 290

【0038】以下の式(13)は、別のマウスエビモル *を示す。
 フィン(アイソフォームA)をコードする遺伝子の配列*

式(13)

ATG CGG GAC CGG CTG CCC GAC CTC ACG GCG TGT AGG ACA AAC GAC GAT 16
 GGA GAC ACT GCT GTC GTC ATT GTG GAG AAG GAT CAT TTC ATG GAC GGT 32
 TTC TTC CAT CAG GTA GAG GAG ATT CGA AGC AGC ATA GCC AGG ATT GCT 48
 CAG CAT GTA GAA GAC GTG AAG AAG AAC CAC AGC ATC ATC CTG TCT GCT 64
 CCA AAC CCA GAA GGA AAA ATA AAA GAA GAG CTG GAG GAC CTG GAC AAA 80
 GAG ATC AAG AAA ACT GCT AAC AGG ATC CGG GGC AAG CTG AAG TCT ATT 96
 GAG CAG AGC TGT GAT CAG GAC GAG AAT GGG AAC CGA ACT TCA GTG GAT 112
 CTG CGG ATA CGA AGG ACC CAG CAC TCG GTG CTG TCA CGG AAG TTT GTG 128
 GAC GTC ATG ACA GAA TAC AAT GAA GCG CAG ATC CTG TTC CGG GAG CGA 144
 AGC AAA GGC CGC ATC CAG CGC CAG CTG GAG ATC ACT GGG AGG ACC ACC 160
 ACT GAC GAC GAG CTG GAA GAG ATG CTG GAG AGC GGG AAG CCG TCC ATC 176
 TTC ATC TCG GAT ATT ATA TCA GAT TCA CAA ATC ACT AGG CAA GCT CTC 192
 AAT GAG ATC GAG TCC CGC CAC AAA GAC ATC ATG AAG CTG GAG ACC AGC 208
 ATC CGA GAG CTG CAC GAG ATG TTC ATG GAT ATG GCC ATG TTT GTC GAG 224
 ACT CAG GGT GAA ATG GTC AAC AAC ATC GAG AGA AAT GTG GTG AAC TCT 240
 GTA GAT TAC GTG GAA CAT GCC AAG GAA GAG ACG AAG AAA GCC ATC AAA 256
 TAC CAG AGC AAG GCC AGG CGG AAG GTG ATG TTC GTC CTC ATT TGT GTA 272
 GTC ACT TTG CTT GTG ATC CTT GGA ATT ATT CTC GCA ACA GCA TTG TCA 288
 TAG 289

【0039】以下の式(14)は、また別のマウスエビ 配列を示す。
 モルフィン(アイソフォームB)をコードする遺伝子の

式(14)

ATG CGG GAC CGG CTG CCC GAC CTC ACG GCG TGT AGG ACA AAC GAC GAT 16
 GGA GAC ACT GCT GTC GTC ATT GTG GAG AAG GAT CAT TTC ATG GAC GGT 32
 TTC TTC CAT CAG GTA GAG GAG ATT CGA AGC AGC ATA GCC AGG ATT GCT 48
 CAG CAT GTA GAA GAC GTG AAG AAG AAC CAC AGC ATC ATC CTG TCT GCT 64
 CCA AAC CCA GAA GGA AAA ATA AAA GAA GAG CTG GAG GAC CTG GAC AAA 80
 GAG ATC AAG AAA ACT GCT AAC AGG ATC CGG GGC AAG CTG AAG TCT ATT 96
 GAG CAG AGC TGT GAT CAG GAC GAG AAT GGG AAC CGA ACT TCA GTG GAT 112
 CTG CGG ATA CGA AGG ACC CAG CAC TCG GTG CTG TCA CGG AAG TTT GTG 128
 GAC GTC ATG ACA GAA TAC AAT GAA GCG CAG ATC CTG TTC CGG GAG CGA 144
 AGC AAA GGC CGC ATC CAG CGC CAG CTG GAG ATC ACT GGG AGG ACC ACC 160
 ACT GAC GAC GAG CTG GAA GAG ATG CTG GAG AGC GGG AAG CCG TCC ATC 176
 TTC ATC TCG GAT ATT ATA TCA GAT TCA CAA ATC ACT AGG CAA GCT CTC 192

35

AAT GAG ATC GAG TCC CGC CAC AAA GAC ATC ATG AAG CTG GAG ACC AGC 208
 ATC CGA GAG CTG CAC GAG ATG TTC ATG GAT ATG GCC ATG TTT GTC GAG 224
 ACT CAG GGT GAA ATG GTC AAC AAC ATC GAG AGA AAT GTG GTG AAC TCT 240
 GTA GAT TAC GTG GAA CAT GCC AAG GAA GAG ACG AAG AAA GCC ATC AAA 256
 TAC CAG AGC AAG GCC AGG CGG CAA CAG CAT TGT CAT AGC AAC CGT ACC 272
 CCA AGA GCT CTT TGT CCT CGG TGA 280

【0040】以下、本発明について更に詳述する。本発明のエピモルフィン¹⁰は、277ないし289個のアミノ酸からなる蛋白質をコア蛋白質とし、間充細胞により生合成される物質であり、動物細胞内では修飾されて、マウスの細胞内では、約150kダルトン、ヒトの細胞内では、約70kダルトン（ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動法による）の分子量になる。遺伝子のスプライシングにより、少なくとも3種類のタイプが存在し、そのうちの1種類（エピモルフィンアイソフォームB）は、分泌型であるが、他の2種類（エピモルフィン、エピモルフィンアイソフォームA）は、20ないし30アミノ酸残基の疎水性蛋白質の配列をカルボキシ末端に有しているため細胞膜に結合する性質を有する。

【0041】これらの分子は、間充細胞に存在して、上皮の形態を制御する重要な機能を有する。このことは、皮膚、小腸、肺等の器官培養に、本発明を完成するのに用いたエピモルフィンの機能を阻害する抗体を加えた実験や、そして、エピモルフィンを作る能力の低下した間充細胞と上皮組織の組合せ培養実験において、エピモルフィンが機能しない場合は正常な組織形成が行われないという事実から、確認できる。更には、このことは、上記の培養実験において、エピモルフィンを添加すると、³⁰上皮の正常な組織形成能が回復するという事実からも、確認できる。

【0042】エピモルフィンは、抗体を用いた組織染色により、特に胎児発生時、及び組織再生時に、組織形成が進行中の上皮と間充細胞の境界、もしくはその近傍の間充細胞内に、あるいは上皮の分裂が旺盛な部分の近傍の間充細胞内に、強く発現することが分かった。例えば、胎児発生期、及び再生時の皮膚組織においては、エピモルフィンは、真皮と表皮の境界部分や毛包形成を誘導すると考えられる未熟毛包先端部近くの間充細胞に、強く発現する。また、胎児発生期の小腸や肺においては、エピモルフィンは、管腔形成や分枝の行われている上皮に接する間充細胞で、強く発現する。

【0043】このように、エピモルフィンは、組織形成が行われる時に、組織形成が行われている上皮の近くの⁴⁰間充細胞内、強く発現するが、しかし、エピモルフィンは、間充細胞でのみ作られており、エピモルフィンは、その時の上皮細胞内においては作られていない。

【0044】また、マウスのエピモルフィンと、ヒトのエピモルフィンは、アミノ酸レベルで約90%の相同性があり、動物種が異なっても良く保存されている分子で

あることが分かった。

【0045】更に、本発明者らが見出したエピモルフィン分子群は、いずれも、下記の式（2）で表されるアミノ酸配列をアミノ末端に共通して有しており、そのアミノ末端アミノ酸配列は既知の生体由来蛋白質のそれとは異なることが分かった。

式（2）

Met Arg Asp Arg Leu Pro Asp Leu Thr Ala Cys

【0046】また、このエピモルフィン分子群に共通するアミノ末端アミノ酸配列部分は、その部分をコードする遺伝子レベルにおいても、下記の式（1）で表される塩基配列と同一もしくはほとんど同一の塩基配列を有しているため、式（1）で表される塩基配列の相補鎖をプローブとして、エピモルフィン分子群をコードするすべての遺伝子を検出、同定できることが分かった。

式（1）

ATG CGG GAC CGG CTG CCA GAC CTG ACG GCG TGT AGG

【0047】本発明のエピモルフィンは、広く動物の間充細胞から得ることができるが、本発明においては、かかるエピモルフィンの活性を損なわない範囲で、単にその一部のアミノ酸を除去、挿入、修飾あるいは追加する等の改変を行ったものも、本発明のエピモルフィンに包含されることは言うまでもない。

【0048】また、エピモルフィンをコードする遺伝子⁵⁰も、同じアミノ酸をコードする他の塩基配列への置き換えはもとより、コードされるエピモルフィンが、活性を損なわない範囲で、単にその一部の塩基を除去、挿入、あるいは追加する等の改変を行ったものも、本発明のエピモルフィンをコードする遺伝子に包含される。尚、本明細書においては、塩基配列については、相補的な塩基配列を省略し、1本鎖のみを記載した。

【0049】本発明のエピモルフィン及びそれをコードする遺伝子のDNA断片は、例えば、以下の様な方法によって得ることができる。

【0050】（mRNAの調製）まず、皮膚、小腸、肺、胎盤、へその緒等の結合組織を、あるいは間充細胞由来の培養株化細胞を、グアニジウムチオシアネート等の水溶液中でホモジナイズし、そして、Chirgwinらの方法[Biochemistry, 18, 5294-5299 (1979)]に従って、塩化セシウム平衡密度勾配遠心法、あるいは蔗糖密度勾配遠心法によって、全RNAを沈澱として分離する。

【0051】分離後、フェノール抽出、エタノール沈澱により、全RNAを精製し、これをオリゴ(dT)セル

ロースカラムクロマトグラフィーにかけて精製して、目的のエピモルフィンのmRNAを含むポリ(A)含有mRNA [poly(A) mRNA] を単離し、mRNA群を得る。蔗糖密度勾配遠心法によって、更に、これらのmRNA群を精製し、目的とするエピモルフィンのmRNAの含量を高めて、遺伝子を得る可能性を高める。

【0052】このmRNA群を原料として使用し、以下に詳述する通り、Huynhらが報告している方法 [DNA Cloning, IRL Press, 49-78 (1984)] に従って、cDNAライブラリーを作成し、次に、本発明者等が、動物に間充細胞を免疫することにより得た、主としてエピモルフィンの活性を阻害する効果を有することによりエピモルフィンに反応することを確認できた抗エピモルフィンモノクローナル抗体を用いて、Youngらの方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 1194 (1983)] に従って、cDNAの翻訳産物と抗体の結合の有無により、エピモルフィンをコードする遺伝子を同定、単離する。

【0053】(第1段階) 上記で調製したmRNA群と、例えば、オリゴ(dT)プライマー等のプライマードNAとをハイブリダイズさせ、逆転写酵素、及びDNAポリメラーゼIを用い、Gublerらの方法 [Gene, 25, 263 (1983)] に従い、2本鎖cDNAを合成する。

【0054】(第2段階) 次いで、得られたcDNA鎖の両端末に、EcoRI等の酵素切断サイトを片端に持つアダプターを付加する。

【0055】(第3段階) 上記のcDNA鎖を発現可能なプロモーターを有する、例えば、 λ gt11などの入ファージベクター、又はプラスミドベクターのEcoRI切断部位等に挿入して、組換え入ファージDNA群又は組換えプラスミドDNA群を得る。

【0056】(第4段階) 上記で得られた組換え入ファージDNA群を材料とし、市販の、例えば、ギガバックIIゴールド (Statagene社) などのイン・ビトロ・パッケージング・キットを、説明書に従い使用し、いわゆるイン・ビトロ・パッケージングを行い、組換え入ファージDNAを有する入ファージ粒子を得ることが出来る。得られた入ファージ粒子を、常法に従い、宿主、例えば大腸菌に感染導入し、入ファージ粒子を増殖させる。また、組換えプラスミドDNA群では、常法に従い、宿主、例えば大腸菌を形質転換し、増殖させる。

【0057】(第5段階) 適当な試薬、例えば、lacプロモーターを有するベクターの場合イソプロピル β チオガラクトピラノシド (IPTG) などを用いて、菌に挿入したDNAの産物を含む蛋白質を合成させ、それを、ニトロセルロース等の膜に吸着させた後、抗エピモルフィン抗体を用いて、常法により、エピモルフィンの一部

を合成しているクローンを同定する。エピモルフィンをコードするcDNAの一部を得た後では、そのcDNAの一部をプローブとして使用し、例えば、以下のような方法により、エピモルフィンの非翻訳領域を含む全長cDNAはもとより、他の動物種のエピモルフィンをコードするcDNA等を、容易に単離することができる。すなわち、同定したい動物種の結合組織を用いて、上記(mRNAの調製) から(第4段階) までは、上記と同じ操作を行い、第5段階を、次の通りに行う。

【0058】(第5段階) 適当な核酸結合能を有する膜、例えば、ナイロン膜にDNAを移しとり、アルカリ等で変性させ、予め放射性物質等でラベルした入手済みのエピモルフィン遺伝子をプローブとして使用し、ハイブリダイズさせることにより、目的のエピモルフィン遺伝子の全長もしくは一部が組込まれているクローンを同定する。

【0059】得られたエピモルフィンをコードするcDNAを用いて、他の動物種のエピモルフィンをコードするcDNA等を単離する別の方法として、ポリメラーゼ・チェーン・リアクション (PCR) 法 [Methods Enzymol., 155, 335-350 (1987)] がある。

【0060】すなわち、エピモルフィンの遺伝子は、動物種間の相同性 (ホモロジー) が高いので、エピモルフィンの非翻訳領域も含めたcDNAの塩基配列中で、他の物質との相同性が低い部分を未同定エピモルフィン遺伝子を増幅させる開始部分として選り、間充細胞から精製、調製したcDNA群に加え、ポリメラーゼで相補鎖を増幅させることにより、相同性の高い遺伝子として、エピモルフィンのアイソフォームや他の動物種のエピモルフィンをコードするcDNAを得ることも可能である。

【0061】かくして得られるcDNAの発現は、例えば、トランジェントなin vitroの蛋白翻訳系、具体的には、Nature, 329, 836-838 (1987) に記載されているような、アフリカツメガエルの卵母細胞内での翻訳系、あるいは、該DNAをpUC19等のプラスミドのプロモーターの下流に翻訳開始コドンATGとフェーズを合わせて接続した蛋白質発現用プラスミドを導入した大腸菌、株化動物細胞などの宿主内で行う翻訳系等、を用いて行うことができる。次いで、常法に従い、例えば、抗エピモルフィン抗体を結合させたアフィニティカラムを用いて発現された蛋白質を回収することにより、本発明のエピモルフィンを得ることができる。

【0062】天然のエピモルフィンと同等の機能を有し、可溶性で、取扱の容易な改変エピモルフィン得る方法については、エピモルフィン分子自体を生化学的手法を用いて切断してもよいが、特に、エピモルフィンをコードする遺伝子を改変し、これを用いて、改変エピモル

フィンを得る方法が好適に用いられる。この場合の具体的な手法は、特に限定されないが、例えば、疎水領域をコードする配列を制限酵素等で切断、削除することでもできるし、また、連続した疎水性アミノ酸が正しく翻訳されないよう、この翻訳領域上流からフレームシフトを起こさせることもできる。

【0063】特に、疎水性アミノ酸配列を含む部分を非疎水性アミノ酸配列に置換する場合は、疎水性アミノ酸配列を含む部分をコードする遺伝子を削除後、所望の非疎水性アミノ酸配列をコードする遺伝子を削除部分につなぎ込めば、容易に目的の改変エビモルフィンにコードする遺伝子が得られる。すなわち、前述の各種方法により単離されたcDNAを、動物細胞発現ベクター等に組み込み、次に、適当な制限酵素による消化、末端平滑化、再連結の操作により、エビモルフィンのC末端疎水領域をコードする部分を欠損もしくは非疎水性アミノ酸配列をコードする遺伝子に置換することができる。

【0064】適当なベクターに連結された改変させたエビモルフィン遺伝子は、大腸菌又は動物細胞等に導入され、これらの宿主を適当な条件下で培養して、導入遺伝子を発現させることにより、改変エビモルフィンが得られる。前者では、菌のライセート上清から、改変エビモルフィンポリペプチドが回収される。また、後者では、培養上清から、改変エビモルフィンが回収されるが、これらの回収方法については、種々の方法、例えば、免疫アフィニティクロマトグラフィを用いた方法等を、好適に利用することができる。

【0065】かくして得られる可溶性の改変エビモルフィンもしくは改変エビモルフィンポリペプチドは、生理的な溶液に容易に溶解できる特性を有しているため、容易に大量生産及び精製が可能であり、そして、種々の用途、例えば、上皮の形態異常の原因解明や、その診断、治療等に、そのまま使用できる利点がある。

【0066】上述の各種方法で得られたエビモルフィンもしくはその改変体の製造、ないしは精製工程は、極めて膨大、かつ複雑であり、その収量の低さからも、実際の研究開発、応用開発への材料提供に大きな問題を残している。更に、エビモルフィンの測定は、バイオアッセイ（生物学的検定法）による上皮組織の形態変化を促す活性量としての測定方法では、操作性、及び精度に劣ることはもとより、常に測定値（活性）に干渉する成分の存在を考慮する必要がある。

【0067】上記の各種方法で得られたエビモルフィンを用いて、それらに特異的に結合する新規なポリクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体を得ることにより、これらの問題を解決することができる。すなわち、本発明のポリクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体を利用することにより、抗原抗体反応を利用したエビモルフィンの免疫学的精製手段、ならびにエビモルフィンの免疫学的測定手段等が提供される。本発明のポリク

ローナル抗体、及びモノクローナル抗体は、エビモルフィンに特異的な結合性を有することをその最大の特徴としており、そして、かかる抗体には、エビモルフィンの活性を阻害しない、ないしは阻害するタイプの抗体が含まれる。また、本発明のポリクローナル抗体には、抗エビモルフィン抗血清も含まれる。

【0068】エビモルフィンに対するポリクローナル抗体、及びモノクローナル抗体は、前述の各種方法で得られたエビモルフィンの完全体もしくはその一部分を免疫抗原として使用して、通常の抗体の製造方法に準じて製造することができる。当該免疫抗原としてのエビモルフィンは、その完全体に限らず、その適宜の一部を使用することができる。但し、本発明の抗体の製造においては、必ずしもエビモルフィンの精製標品を用いる必要はなく、これを含む細胞や組織などの粗精製品を使用することも可能である。

【0069】本発明のポリクローナル抗体製造方法は、より具体的には、上記免疫抗原を、ラット、マウス、ハムスター、ウサギ、ヤギ等の哺乳動物に免疫し、以降、部分採血した血清中に、免疫抗原に強く結合する抗体群が検出されるまで、同様の免疫操作を繰り返す。免疫に用いる動物種は、免疫抗原の由来する動物種とは異なる動物種を用いる限りにおいては、特に限定されない。免疫は、一般的方法により、例えば、上記免疫抗原を哺乳動物に静脈内投与、皮下注射もしくは腹腔内注射等の方法により投与することにより行われる。

【0070】より具体的には、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）等で適当量に希釈、懸濁した免疫抗原を、所望により、免疫賦活剤として、通常のアジュバントを併用して、動物に、2～21日毎に数回投与し、総投与量が、約100～500マイクログラム/動物程度になるようにするのが好ましい。

【0071】免疫感作後の動物から血液を採取し、血清成分を分離して、目的の抗血清、すなわち未精製のポリクローナル抗体を得ることができる。更に、得られた抗血清を、透析、濃縮液アンモニウム液での塩析出、ゲル濾過法、抗免疫グロブリン抗体結合アフィニティクロマトグラフィ等の従来の技術を用いて、抗体成分を精製し、目的のポリクローナル抗体を得ることができる。更に、精製された免疫抗原を用いた免疫アフィニティクロマトグラフィにより、ポリクローナル抗体の反応特性を高めることができる。

【0072】本発明のモノクローナル抗体製造方法は、より具体的には、上記のエビモルフィンに対するポリクローナルを得る方法と同様にして、哺乳動物を免疫感作し、その動物から採取した抗体産生細胞を、哺乳動物のミエローマ細胞と融合させて融合細胞（ハイブリドーマ）群を作成し、これらより、免疫抗原を認識する抗体を産生するハイブリドーマのクローンを選択し、該クローン化されたハイブリドーマにより、目的とするモノク

ローナル抗体を産生させることにより得られる。

【0073】用いる免疫感動物種は、細胞融合に使用するミエローマ細胞との適合性を考慮して、選択するのが好ましく、一般には、アルメニアンハムスター、マウス、ラット等が有利に使用される。実験目的での使用頻度が高いマウス由来のエピモルフィンの場合、近縁種のラットを免疫感動物として用いても、目的のモノクローナル抗体を得ることができる。抗体産生細胞としては、免疫抗原の最終免疫の約3日後に摘出した脾細胞を使用するのが好ましい。

【0074】上記抗体産生細胞と融合されるミエローマ細胞としては、既に、公知の種々の細胞株、例えば、P3×63Ag8(ATCC TIB 9)、P3×63Ag8.U.1(ATCC CRL 1597)、P3/NS1/1-Ag4-1(ATCC TIB 18)、Sp2/0-Ag14(ATCC CRL 1581)、FO(ATCC CRL 1646)、P3×63Ag8.653(ATCC CRL 1580)、S194/5.XXO.BU.1(ATCC TIB 20)等や、ラットにおけるYB2/0(ATCC CRL 1662)等が使用される。

【0075】上記抗体産生細胞とミエローマ細胞との融合反応は、基本的には、公知の方法、例えば、ミルスタインら(Milstein et al.)の方法[Methods Enzymol., 73, 3-46(1981)]等に準じて行い得る。より具体的には、上記融合反応は、例えば、融合促進剤の存在下に通常の培養培地中で行われる。融合促進剤としては、通常用いられるもの、例えば、ポリエチレングリコール(PEG)、センダイウイルス(HVJ)等が使用され、更に、所望により、融合効率を高めるために、ジメチルスルホキシド等の補助剤を添加使用することもできる。

【0076】抗体産生細胞とミエローマ細胞との使用数は、通常の方法と変わりがなく、例えば、ミエローマ細胞に対し、免疫細胞を約1~10倍程度用いればよい。上記融合時の培地としては、例えば、上記ミエローマ細胞の増殖に使用される如きRPMI-1640培地、MEM培地、その他、この種の細胞培養に使用される通常の各種培地を利用でき、通常は、牛胎児血清等の血清補液を抜いておくのがよい。

【0077】融合は、上記抗体産生細胞とミエローマ細胞との所定量を、上記培地内でよく混合し、予め37℃程度に加温したPEG溶液、例えば、平均分子量1000~6000程度のPEGを、通常培地に、約30~60%(W/V)の濃度で加えて、混ぜ合わせることにより行われる。以後、適当な培地を逐次添加して、遠心し、上清を除去する操作を繰返すことにより、所望のハイブリドーマが形成される。

【0078】得られる所望のハイブリドーマの分離は、通常の選別用培地、例えば、HAT培地(ヒポキサンチン

ン、アミノプテリン及びチミジンを含む培地)で培養することにより行われる。該HAT培地での培養は、ハイブリドーマ以外の細胞(未融合細胞等)が死滅するのに十分な時間、通常数日~数週間、行えばよい。かくして得られるハイブリドーマは、通常の限界希釈法に従い、目的とする抗体の産生株の検索及び単一クローン化が行われる。

【0079】該産生株の検索は、例えば、ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)法などの、一般に抗体の検出に用いられている種々の方法〔「ハイブリドーマ法とモノクローナル抗体」(株)R&Dプランニング発行、p30~53、昭和57年3月5日〕に従って行われる。すなわち、固相に塗布された免疫抗原に、クローン化されたハイブリドーマの培養上清、及び酵素を標識された免疫に用いた動物種の免疫グロブリンに対する抗体を、順次、加えては、洗浄し、最後に、標識された酵素により、発色反応を起こす基質液を加えて、発色度を調べることにより、クローン化されたハイブリドーマの培養上清に含まれるモノクローナル抗体の免疫抗原への結合能を評価できる。尚、上記検索における抗原としては、精製免疫抗原を好ましく使用できる。

【0080】かくして得られる所望のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、血清を含む通常の培地で離代培養でき、また液体培養中で長期間保存可能である。該ハイブリドーマからの本発明モノクローナル抗体の採取は、該ハイブリドーマを、常法に従って、培養し、その培養上清として、あるいは、ハイブリドーマをこれと適合性のある哺乳動物に投与して増殖させ、その腹水として得る方法等が採用される。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適しており、後者の方法は、抗体の大量生産に適している。更に、上記の方法により得られるモノクローナル抗体は、前述のポリクローナル抗体の精製と同様の操作で精製することができる。

【0081】かくして得られる本発明のポリクローナル抗体、及びモノクローナル抗体は、これを利用して、例えば、免疫沈降法、免疫アフィニティクロマトグラフィ、プロテインAカラム等の通常の免疫学的精製手段により、改変体を含むエピモルフィンを簡易、かつ特異的に精製できる。更に、放射免疫測定法(RIA)、酵素免疫測定法(EIA)、蛍光抗体法等の通常の免疫学的測定手段により、高感度、高精度に、かつ高い特異性をもって、エピモルフィンを簡易に測定、検出することができる。

【0082】

【実施例】以下に実施例1~14を挙げて本発明をより具体的に説明するが、本発明は、以下の実施例に限定されるものではない。

【0083】1. マウスエピモルフィンに対するモノクローナル抗体の作製

a) 免疫抗原として、エピモルフィンを細胞膜表面に持つマウス胎児の真皮細胞を用いた。集塊状で培養した間充細胞では、エピモルフィンが、作られて、上皮の形態形成を支持するが、これに対して、扁平な細胞形態をとる単層で培養した間充細胞では、エピモルフィンは、ほとんど作られず、上皮の形態形成が行われない、という本発明者らが見出した知見に基づいて、以下の1)~5)の手順で実験動物のICRマウス胎児5匹分の皮膚組織から分離した間充細胞(真皮)細胞を、集塊状で4日間培養した後、ホモジナイズし、そして、生理食塩水に懸濁した。

【0084】1) 妊娠13日目のICRマウス(日本チャールリバー)より摘出したマウス胎児5匹分の皮膚組織を手術用のハサミで切り取り、生理食塩水で洗浄した。

2) 1)で準備したマウス胎児皮膚組織を0.25%トリプシン、10mM CaCl₂を含むHEPES-ハンクス液(pH7.4)中で、4℃条件下12時間インキュベートした後、20μg/mlのDNAaseを加えてゆっくりとビベティングすることにより、シート状の表皮と単離された真皮細胞を得た。

【0085】3) 2)の細胞懸濁液を低速遠心分離することにより表皮と、上清中の真皮細胞を分離した。なお、この操作以降は10%の牛胎児血清を含む、ダルベッコ変法イーグル培地(DME)とハムF12培地の1:1混合培地(DH培地)を用いた。

【0086】4) 単離真皮細胞を培地で洗浄後、1000rpmで2分間遠心分離し、得られた真皮細胞のペレットからマイクロペットを用いて100μlずつを吸引して、培地上に浮かべた多孔性ヌクレオポアメンブレン(13mm径、8μm孔)上に乗せて集塊状で培養した。

5) 37℃、5%CO₂条件下で4日間培養した上記真皮細胞を無血清培地中に懸濁し、洗浄後、生理食塩水中に分散したものを抗原として用いた。

【0087】この懸濁液に、等量のプロインド コンブリート アジュバント(Freund complete adjuvant, Difco Laboratories, Detroit Michigan USA)を加えて、よく混合したものを、Lewisラットに腹腔内投与した。更に、2週間、及び3週間後に、同液を同様にLewisラットに投与した。最終投与の3日後に、脾臓を摘出し、得られた脾細胞を、実施例13と同様の方法で、マウスミエローマ細胞株P3×63Ag8. U. 1(ATCC CRL 1597)と細胞融合し、ハイブリドーマ群を得た。

【0088】得られたハイブリドーマ群を、後記の実施例13と同様の方法で、限界希釈法によりクローニングした後、エピモルフィンに結合する抗体を産生するハイブリドーマのクローンを、次の方法で選別した。すなわち、一次スクリーニングとして、集塊状で培養した間充

細胞の溶解物と結合し、単層で培養した間充細胞の溶解物とは結合しないモノクローナル抗体を作るハイブリドーマを選別し、更に、二次スクリーニングとして、免疫原に用いたエピモルフィンを含むサンプルを、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)で流した時に特異的に出現する、分子量約150Kダルトンのエピモルフィンのバンドに反応するモノクローナル抗体を作るハイブリドーマを、Westernblot法により、モノクローナル抗体(ハイブリドーマの培養上清)と放射性物質をラベルした抗ラット免疫グロブリン抗体を順次反応させて検出することにより選別した。スクリーニングの詳細は次のとおりである。

【0089】1) 一次スクリーニング: 集塊状で、もしくは、単層で10%牛胎児血清を含むDH培地で4日間培養したマウス胎児真皮細胞を、各々2%SDS(ドデシル硫酸ナトリウム)溶液中に溶解したものを、抗原としてドットプロット法で抗体反応を調べた。ドットプロットはバイオラッドラボラトリーズ社のBio-Dot blotterを用いて行い、ニトロセルロース膜上に上記抗原を吸着させた。同ニトロセルロース膜にハイブリドーマ培養上清、HRP(ホースラッディシュペーオキシダーゼ)標識抗ラット免疫グロブリン抗体(2次抗体)を順次反応させ、最後にジアミノベンチジンを含む基質液を加えて発色反応させて、集塊状培養の真皮細胞に対し陽性を示し、単層培養の真皮細胞に対し陰性を示す抗体を作るハイブリドーマを選別した。

【0090】2) 二次スクリーニング: Laemmliの方法(Nature, 227, 680(1970))に従い、1)で用いた集塊状培養真皮細胞溶解液をSDS-PAGE用サンプル液に加え、5分間煮沸後、4~20%グラジエントゲルで電気泳動を行った。ウェスタンブロットはテフコ社(長野、日本)のModel T. C. 808を取扱説明書通りに使用して、ゲル中の蛋白質をニトロセルロース膜に移し取り、同ニトロセルロース膜にハイブリドーマ上清、¹²⁵Iラベル抗ラット免疫グロブリン抗体を順次反応させた。分子量マーカーで150Kダルトンの位置のエピモルフィンのバンドが陽性になった抗体を作るハイブリドーマを選別した。かくして、所望の反応特異性を有する本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得た。

【0091】更に、これらのモノクローナル抗体のうち、器官培養系に加えると、上皮の構築を阻害するもの、すなわち、エピモルフィンの活性部位を認識するものを、下記の方法で選別し、このハイブリドーマをクローン12(clone 12)、モノクローナル抗体をMC-1(mAb 12と記することもある)と名付けた。すなわち、形態形成が活発に行われる時期(妊娠11日目の肺、13日目の皮膚、小腸)のマウス胎児組織の器官培養を、ICR妊娠マウスより無菌的に取り出し

45

たマウス胎児の組織切片を10%牛胎児血清を含むDH培地上に浮かべたヌクレポアメンブレン(13mm径、8μm孔)上に乗せて培養する方法で行った。そのうちの半分は培地中に、300マイクログラム/mlの下記b)に示す方法で精製したモノクローナル抗体存在下で行った。

【0092】対象として、モノクローナル抗体と同様の手法で精製したラットIgGを同濃度で培地に加えたものを同時に用いた。モノクローナル抗体MC-1(mAb12)を添加した器官培養3日目の組織切片を、図1に示す。コントロールでは、各臓器が上皮構造が正常に構築(肺胞形成、小腸ヒダの形成等)されているのに対し、MC-1(mAb12)の存在下、すなわち、エビモルフィンの活性を阻害した場合には、上皮組織が異常になっていることが判る。尚、当該ハイブリドーマのクローン12(clone12)は、受託番号:微工研条寄第4026号(FERM BP-4026)として、国際寄託当局である通産省工業技術院微生物工業技術研究所に寄託されている。

【0093】b)上記a)で得られたクローン12を、12%の牛胎児血清を含むダルベッコ変法MEMと、Ham F12の等量混合培地(DH)にて、5%炭酸ガスインキュベーター中で、37℃にて継代培養を行い、更に、細胞を無血清DHにて、2回洗浄後、無血清DH中で、1週間培養することで、MC-1(mAb12)を含む血清入りDH、及び無血清DHを、それぞれ、61得た。これらを、50%硫酸アンモニウムで塩析し、PBSで透析後、抗ラットIgGカラム(アメリカンコーレックス社)でアフィニティ精製を行った。抗体は、更に塩析後、DHで十分に透析を行い、約5mg/mlの精製品を得た。

【0094】2. マウスエビモルフィンcDNAの単離
マウス胎児間充細胞から調製したmRNAを、オリゴ(dT)セルロースカラムにより精製し、これを出発材料として、λgt11(アマシャム社)の系で、cDNAライブラリーを作成した。マウス胎児間充細胞は、ICR妊娠マウス(日本チャールスリバー社)からマウス胎児を摘出し、実施例1と同様の方法で、カルシウムの存在下でトリプシン消化を行って、間充細胞を単離後、集合塊にして培養したものを使用した。

【0095】mRNAの調整は次の様に行った。細胞を式(15)

```

GGGCGGGCGG GCTGTGCGGT GGCAGCGCCT GCGGAGGGA GGGCGGGGC GCGGGGCGAG 60
GACCCCGGCA GCAAGAGGGG GCGATCGGGC CACCGAGAG TGTGCGGGG GGCAGCTGAG 120
CGGCGGGTGC CCGCGCCCTG TGGCGGTGG GCGATCGGGA CGGCTGCCC GACCTCAAGG 180
CGTGTAGGAC AAACGACGAT GGAGACACTG CTGTGTCAT TGTGGAGAG GATCAITTTCA 240
TGGAGGGTTT CTTCCATCAG GTAGAGGAGA TTGGAAGCAG CATAGCCAGG ATTGCTCAGC 300
ATGTAGAAGA CGTGAAGAAG AACACAGCA TCATCTGTC TGCTCCAAAC CCAGAAGGAA 360
AAATAAAGA AGAGCTGGAG GACCTGGACA AAGAGATCA GAAACTGCT AACAGGATCC 420
GGGCAAGCT GAAGTCTATT GAGCAGACT GTGATCAGGA CGAGAATGG AACCGAATT 480

```

46

回収し、5.5Mグアニジウムチオシアネート(GTC)溶液中で、ポリトロン型ホモジナイザーを用いて、細胞をホモジナイズした。遠沈管にセシウムトリフロアセテート(CsTFA)-0.1M EDTA液を入れ、その上に上記の溶液を重層し、23,000rpm、15℃で24時間遠心し、RNAのペレットを得た。次に、ペレットを4M GTC液に溶かし、10,000rpm、10分間の遠心で不溶物を除去した。上清に1M酢酸100μlとエタノール3mlを加え-20℃で3時間静置後、10,000rpm、20分間遠心し、得られたRNAのペレットをTE(Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM)液、少量に溶かし、た。

【0096】更に、1M Tris(pH9.0)1/10倍量、5M NaCl 1/50倍量、10%SDS 1/20倍量、フェノール(0.1M Tris-HCl(pH9.0)飽和)1/2倍量、クロロホルム・イソアミルアルコール(24:1)1/2倍量を加えて10分間振盪後、3000rpm、10分間冷却遠心し、水層を回収した。更に、等量のクロロホルム・イソアミルアルコールを加えて同様の操作を行った。最後に、3M酢酸ナトリウム1/10倍量、冷エタノール2.5倍量を加えて、混和後、-20℃で10時間静置し、15000rpm、10分間の遠心でRNAのペレットを得た。

【0097】λgt11DNAに組み込まれた該ライブラリーを、大腸菌Y1090(アマシャム社)に感染させ、該大腸菌をプレートに播いてプラークを形成させた後、IPTGをコートしたニトロセルロース膜でプレートを覆い、導入cDNAの産物とβガラクトシダーゼの融合蛋白を、当該大腸菌に合成させた。ニトロセルロースに吸着したcDNA産物のうち、実施例1で得られた抗エビモルフィン抗体により認識されるものを検索し、それに相当するλgt11のクローンを単離した。最後に、得られたλgt11から単離したエビモルフィンcDNA断片をプローブとして、λgt11の系と同様の手法で合成したλgt10(アマシャム社)のcDNAライブラリーを、再度スクリーニングし、下記の式(15)で表される、エビモルフィンの全長をコードするcDNAを単離した。

【0098】

47 48

CAGTGGATCT GCGGATACGA AGGACCCAGC ACTGGGTGCT GTCACGGAAG TTTGTGGAAG 540
 TCATGACAGA ATACAATGAA GCGCAGATCC TGTTCGGGA GCGAAGCAAA GCGCGCATCC 600
 AGCGCCAGCT GGAGATCACT GGGAGGACCA CCACTGACGA CGAGCTGGAA GAGATGCTGG 660
 AGAGCGGGAA GCGTCCATC TTCATCTGG ATATTATATC AGATTACAA ATCACTAGGC 720
 AAGCTCTCAA TGAGATCGAG TCCCGCCACA AAGACATCAT GAAGCTGGAG ACCAGCATCC 780
 GAGAGCTGCA CGAGATGTC ATGATATGG CCATGTTTGT CGAGACTCAG GGTGAAATGG 840
 TCAACAACAT CGAGAGAAAT GTGGTGAAT CTGTAGATTA CGTGAACAT GCCAAGGAAG 900
 AGACGAAGAA AGCATCAAA TACCAGAGCA AGGCGAGGCG GAAAAAGTGG ATAAITGCTG 960
 CTGTGGCGGT GCGTGTCAIT GCGTCTGG CTCTAATCAT TGGCTTGTG GTTGGCAAT 1020
 GATTGCGTAG ATGGCGCTGG GTGCTTGCT CTCCCTCAGG GTGGCAAGG TGATGTTGT 1080
 CCTCAITTTG GTAGTCACTT TGCTTGTGAT CCTTGGATT ATTCTCGCA CAGCATTTGC 1140
 ATAGCAACCG TACCCCAAGA GCTCTTTGTC CTGGTGACT CCGACCATAC CTGCAGCTTA 1200
 GTCAGCATCC TGCTCTCCA CGAGTGAAC TCAGACTCCA GGGCTAGCGC CGAGCACTGA 1260
 GGTITTTTAT GTGTATGAG AAGAAAGCAC CGCAGAGGT TGTACCATG AAACACCGCG 1320
 AGCCAGTGG ATCGCATG CCAGCCAGA GAGCTGGGT CTCTCTCAAG GACACCACAG 1380
 AGATTTCACA ACAGTGGCT TGGCTTGGTA GCTTTGAAAT AGGAATGATT GAAAAAGCT 1440
 AATTTTAAA GACAATGTCA GTGTAAGAAA TGTATGTTGT GTGTAATTAG GGTGTGCTCT 1500
 GCGCTCAGCT GCGAGTGTG ACGAAGAGAC TTGAGGACG GCGTGTCTC TGTTCATGTC 1560
 TTGTTTGAG AATCATCACA GAAGTGTCT GTAAGGCATC TGAAGTTAA GTTCTTAAT 1620
 CTATTAACAT CTAACCTCC TTTCTAAGT AGACACTGCC TTGCGAAGGA CAATGGGCCA 1680
 GCGCGGGCA AGCATGAACA CTGCCTTACA GCGCTCAGG GCGCTTCTAT AGTGGCTTCT 1740
 GGTGACCTG ACTAGGAAGT GTGAGGCTCT GAAGAGCCTT GAAGCTTATC TCAGGAGGG 1800
 GACAAGCAGT CACATGCCGC ACTCATGTTA CTCTCCCTG TTTATGTGAG GTGATGAAT 1860
 CTCGAAGCAA GCGCAGAGT ACGATGGACC AAAGTGGTG CTCCTAAAC TCAAGAGAA 1920
 GCGCCGAGT ACATAGCCAC TCTGGAATG CACTGAAGG ACCAGGTCT CAGCCCAACA 1980
 CCCACGAGT CCCAGATTC CTAAGAAACC ATGAAGTGTG GATAAAGCT GTGCACTGGT 2040
 TTACACTTGT GAATAGATGG CCGAGCGACC AAGTATGTA AGGATACCAT GACTAGTGAA 2100
 CTCTGCCAAC TGCTGACTGT GATGAGTGT CACTCTACCC CAGCCTCACT TGGTGGGATA 2160
 TGACGTAGCC ATGCGGGTC AGAACACCA GTGTGAGCAA GTGCTACTGA ACTATCTAAA 2220
 AACCATGATC CTTTCACTG TAAGTGTGCC AACTGTGAC CTCTCACAC CTCTGCTCT 2280
 GACACCCAT GTGCGAGAG CTAAGTGCAG AGCTGGGCT GTGGGTCTG GTCTAGAGTT 2340
 AGCTGTAGT GCAGCCACTC CTGCTGATA GCTACCCCT CCGCAACCGG GAGCTCACCC 2400
 TTCTGCTG GAAGCTCACA CTCTGCTCT GGGAGCTCAC CCTCTTGCC TGGGAGCTCA 2460
 CACTTCCGT CTGGGAGCTC AACTTCTCT CTGGGAGCT CACTTCTCT GCGTGGGAGC 2520
 TCACCTTCC GCGCTGGAG CTCACACTTC CTGCTGGGA GCTCTGAAGA TGAACCTGGG 2580
 CCTTTCAGC TCACCTCTC TGATCACTC AGTGCCATCG GATTAGCTG CAGAGACCAT 2640
 GCGTACACC CAGGCTCCA CCAACACAG CAGGCTGCC CTCCAGTCCA GCGTGGGCCC 2700
 TTGGCTGCA GTGTGCTGC AGAGCGCTCA GGAGACCTCT CGACAGGCA GCGAGCTGAA 2760
 TCTGGATTCT CAGTGAATCA GGGGTGTGT GGTGACTGAG TCAGCACTCC AGATACATCT 2820
 CTCTGCTGAC TTCATAGCT ATTTAAAAAT ATATTACAG ATTCCCTGT TACCTTTTCC 2880
 AAGCAITTTCT TCAATAITTT TGTGTTTACA TAAAAAGTT CTCAGAGATG CAAAAAAA 2940

【0099】式(15)のcDNA配列のうち、実際にアミノ酸に翻訳される領域は、153番目から1019番目までの塩基配列部分で、更に、終止コドン3塩基を追加した塩基配列は、前記式(12)に、このcDNAがコードする蛋白質は、前記式(9)に、それぞれ、対応する。

【0100】3. マウスエビモルフィンの精製

a) 実施例1で得られた精製モノクローナル抗体MC-1 (mAb12) を、イソプロパノール、中性磷酸緩衝

生理食塩水 (PBS) で洗浄したアフィゲル10 (バイオラッドラボラトリーズ社) と、5時間、4℃にて反応させ、固定した。IMエタノールアミンで未反応の官能基をブロックした後、PBS、DHにて十分洗浄して、MC-1 (mAb12) 固定化アフィゲル10を調製した。

【0101】b) ICRマウス胎児 (妊娠17日目) の30匹を、ホモジナイズ後、PBSにて洗浄し、20 mMチャップス (ドータイト製) にて、エビモルフィ

ンを含むものを抽出した。a) で調製したアフィゲル10を、カラムに注入し、抽出液を上から注いで、1晩、4℃でインキュベートした。PBSにてゲルを十分洗浄後、15mMの塩酸液を用いて、カラム吸着物を回収して、電気泳動を行ったところ、図2に示すように、エビモルフィンの精製品が得られた。

【0102】4. 動物細胞内でのエビモルフィンの合成
実施例2で得られたマウスエビモルフィンcDNAを、 β アクトチンのプロモーターを有する動物細胞発現ベクターpBactCAT9 (Gene, 48, 1-11, (1986)) のHindIII-HpaI部位に組み込み、内在性のエビモルフィン活性のほとんどないNIH/3T3細胞(ATCC CRT 1658)に導入した。得られたトランスフェクタントは、無処理のNIH/3T3より数倍〜数10倍多い量のエビモルフィンを発現していることが、確認できた(図3)。次いで、実施例3と同様の方法で、発現された蛋白質を回収し、マウスエビモルフィンを得た。

【0103】5. ヒトエビモルフィンcDNAの単離
ヒト胎盤から調製したmRNAを、オリゴ(dT)セルロースカラムにより精製し、これを出発材料として、 λ gt10 (アマシャム社)の系で、常法(Huynhら, 「DNA Cloning」, IRL Press, 49-78 (1984))により、cDNAライブラリーを作成した。当該ライブラリーを、大腸菌NM514 (アマシャム社)に感染させ、プレートに播種した。

【0104】次に、12時間後、ナイロン膜をプレートにかぶせてDNAを移しとり、0.5M-NaOHでDNAを変性させて、 32 Pでラベルした実施例2で得られたマウスエビモルフィン遺伝子の翻訳領域をプローブとして使用し、ヒトエビモルフィン遺伝子の断片を含むクローンを単離した。最後に、得られたヒトエビモルフィン断片を、プローブとして使用し、再度、当該cDNAライブラリーをスクリーニングし、エビモルフィンの全長をコードするcDNAを単離した。

【0105】得られたcDNAは、前配式(3)に対応するヒトエビモルフィンをコードする、前配式(6)に対応する塩基配列で表される翻訳領域と、3'及び5'側に非翻訳領域を含む遺伝子であり、その全長は、約3.0キロベースであることが、アガロースゲル電気泳動により、確認された。

【0106】同様に、前配式(4)、及び(5)に対応するヒトエビモルフィンアイソフォームA、及びBをコードする遺伝子を、単離した。これらは、それぞれ、前配式(7)、及び(8)に対応する塩基配列を翻訳領域として含み、その全長は、それぞれ、約2.9キロベース、及び2.8キロベースであることが、アガロースゲル電気泳動により確認された(図4)。得られたヒトエビモルフィンcDNAの翻訳蛋白質は、実施例2

で得られたマウスエビモルフィンcDNAのそれと90%近い相同性がみられ、エビモルフィンは、極めて種間差の少ない物質であることが分かった。

【0107】6. マウスエビモルフィン(アイソフォームA, B) cDNAの単離

マウス胎児間充細胞から調製したmRNAを、オリゴ(dT)セルロースカラムにより精製し、これを出発材料として、実施例5と同様の方法で、マウスエビモルフィンcDNAの単離を行った結果、3種類の異なる長さのcDNAを得、アガロースゲル電気泳動による全長は、それぞれ、約3.0、2.9、2.8キロベースであった。

【0108】これらのcDNAの塩基配列を調べた結果、最長のものは、実施例2で得られたマウスエビモルフィンと一致し、更に、マウスエビモルフィンのアイソフォームとして、前配式(15)の942番目から1066番目の塩基配列が削除された全長約2.9キロベースのアイソフォームAと、前配式(15)の942番目から1127番目の塩基配列が削除された全長約2.8キロベースのアイソフォームBが、クローニングされた。前者は、前配式(15)の153番目から941番目までと、1067番目から1141番目までの塩基配列を直結した部分が、アミノ酸に翻訳される。

【0109】このcDNA配列に、終止コドン3塩基を追加した塩基配列は、前配式(13)に、このcDNAがコードする蛋白質は、前配式(10)に、それぞれ、対応する。後者は、前配式(15)の153番目から941番目までと、1128番目から1175番目までの塩基配列を直結した部分が、アミノ酸に翻訳され、このcDNA配列に終止コドン3塩基を追加した塩基配列は、前配式(14)に、このcDNAがコードする蛋白質は、前配式(11)に、それぞれ、対応する。

【0110】マウス、ヒト以外の動物種についても、各々の動物組織を用いて、実施例5と同様の方法で、エビモルフィンcDNAを、単離することができる。

【0111】7. エビモルフィンによる肺上皮構造の支持

実施例4で得られたエビモルフィントランスフェクタント、あるいは無処理のNIH/3T3細胞と、マウス胎児から単離した肺上皮組織を混合し、3次元の培養を行った。培養数日で、無処理NIH/3T3細胞を用いた場合には、肺上皮のチューブ形態が破壊されてしまうのに対して、エビモルフィントランスフェクタントを用いた場合には、その形態が保たれたまま上皮が成長をつづけ、エビモルフィンが、上皮組織の形態形成に、極めて重要な役割を担う作用を有するものであることが確認できた。図5に、1週間後の切片の写真を、また、図6に、上皮のうちでチューブ構造をとるものの割合を、それぞれ、示す。

【0112】8. 無細胞系でのエビモルフィンの合成

実施例5で得られたヒトエビモルフィンcDNAを、Bluscript IIベクター (Stratagene社より購入) のポリクローニングサイトに組み込み、RNAポリメラーゼ、及びStratagene社製のmCAPTM RNACapping Kitを利用して、エビモルフィンmRNAを合成した。次に、得られたmRNAを³²S-メチオニンの存在下でウサギ網状赤血球ライセート (アマシャム社) を用いた反応系で反応させて、³²Sでラベルされたヒトエビモルフィンを合成した。

【0113】合成したヒトエビモルフィンは、前記式(3)に対応する288個のアミノ酸配列で表され、その分子量は、約3万3千であることが、SDS-PAGE電気泳動により確認された (図7)。

【0114】同様にして、前記式(4)に対応する287個のアミノ酸配列、及び前記式(5)に対応する277個のアミノ酸配列で表されるヒトエビモルフィンアイソフォームA、及びBを得た。当該ヒトエビモルフィンアイソフォームA、及びBの分子量は、それぞれ、約3万3千、及び3万2千であることが、SDS-PAGE電気泳動により確認された。

【0115】9. 疎水性部分を欠損した可溶性改変エビモルフィンの動物細胞での合成

実施例2で得られたマウスエビモルフィンcDNAを、実施例4と同様にして、 β -アクトチンのプロモーターを有する動物細胞発現ベクターpBactCAT9のHindIII-HpaI部位に組み込みこんだ (BactEPM1)。

【0116】次に、HincII、NheIによる消化、末端平滑化、再連結により、エビモルフィンC末端疎水領域をコードする部分を100%欠損させた遺伝子を作成した (BactEPM2)。BactEPM1、BactEPM2を、NIH/3T3細胞に導入してエビモルフィンの発現を調べたところ、BactEPM1を導入したトランスフェクタントは、主として細胞表面に、また、BactEPM2を導入したトランスフェクタントは、主として培養液中に、それぞれ、エビモルフィンが検出され、後者では、エビモルフィンが可溶化されていることが確認された (図8)。

【0117】上記で得られた2種のエビモルフィントランスフェクタント、あるいは無処理のNIH/3T3細胞各々と、マウス胎児から単離した肺上皮組織を混合し、3次元の培養を行った。培養数日後、無処理NIH/3T3細胞を用いた場合には、肺上皮のチューブ形態が破壊されてしまうの比べ、2種のトランスフェクタントを用いた場合には、いずれも上皮形態が保たれたまま肺胞が成長をつづけ、可溶性エビモルフィンが活性を保持していることが確認された (図9)。

【0118】10. 疎水性部分を欠損した可溶性改変エビモルフィンの大腸菌での合成

実施例2で得られたマウスエビモルフィンcDNAを、pBluscript II KS (+) (Stratagene社) に組み込んだ後、cDNA3'側に存在する制限サイトで切断後、エキソヌクレアーゼIII、Mung Beanヌクレアーゼを利用して、反応時間を変えることにより、エビモルフィン遺伝子が種々の大きくなるように、3'側から欠損させたものを作成した。

【0119】切断面を連結後、それらのプラスミドを、大腸菌JM109 (宝酒造社) に導入して、遺伝子産物を β ガラクトシダーゼとの融合蛋白質として発現させたところ、エビモルフィンのC末端疎水性領域のうち、12個以上のアミノ酸に相当する遺伝子が削除されていたものでは、当該菌をつぶすことにより、容易に融合蛋白質が可溶化されることが判明した。また、N末端から231番目以降のアミノ酸を欠損したエビモルフィンでも、エビモルフィン活性を有することが確認された。尚、前記実施例2で得られたマウスエビモルフィンcDNAを発現用ベクターpBluscript II KS (+) (Stratagene社) に組み込んだ後、大腸菌JM109 (宝酒造社) に導入して得られた形質転換体の大腸菌E. Coli mEPMは、受託番号：微生物研究第4028号 (FERM BP-4028) として、国際寄託当局である通産省工業技術院微生物工業技術研究所に寄託されている。

【0120】11. 疎水性部分を親水性蛋白質に置換した可溶性改変エビモルフィンの合成

実施例5で得られたヒトエビモルフィンcDNAのC末端疎水性領域をコードする部分を、実施例10と同様にして、欠損させた。次に、この欠損cDNAをCD4-IgG遺伝子が組み込まれたベクターCDM8 (Romero and Seed, Cell, 64, 1037-1046, 1991) のCD4領域に、フレームが合うように考慮して、組み込んだ。

【0121】これをDeae-Dextran法 (「Current Protocols in Molecular Biology」Wiley Interscience (1987)) を用いてCOS-1細胞 (ATCC CRL 1650) に導入し、3日後に、培養液を回収した。該培養液を、50%の硫酸アンモニウムにて塩析濃縮後、IgGへの結合能を有するプロテインAの結合した担体を充填したカラム (宝酒造社製) を使用して、C末端の疎水性残基が親水性ペプチドで置換されたヒトエビモルフィン-IgG融合蛋白質を、精製品として大量に回収できた。

【0122】当該ヒトエビモルフィンの改変体は、可溶性が高く、かつエビモルフィンの活性を有することが確認された。他の動物種の改変エビモルフィンについても、各々のエビモルフィンcDNAを用いて、実施例9ないし11と同様の方法で、得ることができる。

【0123】12. エビモルフィンに対するポリクロー

ナル抗体の製造

a) 実施例5で得られたヒトエビモルフィンのcDNAを用いて、実施例10と同様の方法で、可溶性のヒトエビモルフィン-βガラクトシダーゼ融合蛋白質を、大腸菌に作らせた。大腸菌をつぶした懸濁液(ライセート)から溶液を分離し、更に、SDS-PAGEにかけて、可溶性のヒトエビモルフィン-βガラクトシダーゼ融合蛋白質に相当するバンドを切り出して、純度の高いヒトエビモルフィン-βガラクトシダーゼ融合蛋白質の溶液を得た。

【0124】b) a)で得られた可溶性のヒトエビモルフィン-βガラクトシダーゼ融合蛋白質溶液を、等量のフロインド コンプリート アジュバントと混和し、得られた懸濁液をLewisラットに腹腔内投与した。2週、3週間後に、同液を同様に投与した。最終投与の3日後に、ラットの血液を採取し、常法により、血清を分離し、ヒトエビモルフィンに対する抗血清を得た。更に、該抗血清を、50%硫酸アンモニウムで塩析しPBSで透析後、抗ラットIgGカラム(アメリカンコーレックス社)でアフィニティ精製を行い、ヒトエビモルフィンに対するポリクローナル抗体を得た。該ポリクローナル抗体は、βガラクトシダーゼに対する抗体を含むが、哺乳動物の実験に用いる場合は、このまま用いて良い。該ポリクローナル抗体は、ヒトエビモルフィンに特異的に結合する以外に、マウス、ニワトリ等の他の動物種のエビモルフィンにも結合した。

【0125】13. エビモルフィンに対するモノクローナル抗体の製造

実施例3で得られたマウスエビモルフィンを、等量のフロインド コンプリート アジュバントと混和し、得られた懸濁液を、Lewisラットに腹腔内投与した。2週、3週間後に、同液を同様に投与した。最終投与の3日後に、脾臓を摘出し、脾細胞をダルベッコ変法イーグル培地(DME)と、Ham F12の等量混合培地(DH)で、3回洗浄した。マウスミエローマ細胞株P3×63Ag8. U. 1(ATCC CRL 1597)を、同様に洗浄後、その 1×10^7 個と、上記脾細胞 1×10^6 個とを50ml遠心管に入れ、混合した。200×G、5分遠心後、上清を、バスツールピペットで除去した。

【0126】次に、細胞のペレットに、37℃に保温したポリエチレングリコール1500(ペーリンガー・マンハイム山之内社製)50%(W/V)を含むRPMI-1640溶液1mlを、1分間を要して滴下し、混合し、次いで、37℃に保温したRPMI-1640溶液1mlを加えて、1分間放置し、次に、同液2mlを加えて、2分間放置し、更に、同液1mlを加えた。4分間放置後、37℃に保温した12%牛胎児血清、0.05gカペノ/1-硫酸ストレプトマイシン、60000U/1-ペニシリンGカリウムを含有するDH(以下これ

を「DH12」という)の8mlを加え、200×Gで、5分間、遠心分離した。上清を除去し、37℃に保温したDH12に、脾細胞 1×10^6 個/mlとなるように懸濁し、24穴のマイクロプレート(コースター社)に、1mlずつ分注し、37℃下に、5%炭酸ガスインキュベーター内で、培養した。

【0127】24時間後、 1.0×10^{-4} Mヒポキサンチン、 4.0×10^{-7} Mアミノプテリン、及び 1.6×10^{-6} Mチミジンを含む血清入り完全RPMI-1640培地(以下「HAT培地」という)1mlを、各ウェルに添加した。以後、上清の半分を、第2、3、及び4日目に、それぞれ新しいHAT培地に代え、第6日目に、同様に、上清の半分を、 1.0×10^{-4} Mヒポキサンチン、及び 1.6×10^{-6} Mチミジンを含む血清入り完全RPMI-1640培地(HAT培地)に代えた。以後、DH12培地で増殖維持した。

【0128】かくして得られるハイブリドーマを、限界希釈法によりクローニングした。すなわち、ハイブリドーマ 3×10^2 個、及びBalb/c系マウス胸腺細胞 1×10^6 個を含むように調製したDH12培地の20mlを用いて、ハイブリドーマ3個/ウェルとなるように96ウェルのプレートに播き、培養した。増殖してくるハイブリドーマを、同様にハイブリドーマ1個/ウェルとしてクローニングし、更に、増殖してくるハイブリドーマを、同様にハイブリドーマ0.3個/ウェルとして、クローニングした。

【0129】目的の抗体を産生するクローンの選別は、マウスエビモルフィンに対する抗体の結合能を、ELISA法で判定することにより行った。すなわち、実施例10で得られた可溶性のマウスエビモルフィンの溶液を、96穴のイムノプレート(Nunc Intermed社)に50マイクロリッターずつ分注し、4℃で、一晚静置した後、PBS-0.05%ツィーン20(洗浄液)で、ウェルを洗浄した。

【0130】ブロッキング液として、PBS-5%スキムミルク液100マイクロリッター/ウェルを分注し、室温で、1時間静置後、洗浄液でウェルを洗浄した。次いで、ハイブリドーマの培養上清を50マイクロリッター/ウェル入れて室温で1時間反応させてから洗浄液でウェルを洗浄し、更に、ホースラディッシュパーオキシダーゼ標識抗ラット免疫グロブリン溶液(カッペル社)を、50マイクロリッター/ウェル入れて、室温で、1時間反応させてから、洗浄液でウェルを洗浄する操作を行った。

【0131】最後に、常用されるo-フェニレンジアミンと過酸化水素を含む基質液100マイクロリッター/ウェルを分注し、15分間発色反応させた後、硫酸液で反応を停止させ、492nmの吸光度を測定した。目的のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの培養上清は、未使用培養液(陰性対照)の3倍以上の高い吸

光度を示した。かくして、マウスエビモルフィンの活性部位以外の部位に結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得た。このハイブリドーマの培養上清より、実施例1に述べられていると同様の方法で、マウスエビモルフィンの活性部位以外の部位に結合するモノクローナル抗体を精製できた。

【0132】14. エビモルフィンに対するモノクローナル抗体を用いたエビモルフィンの発現調査

マウス胎児および成獣の各種臓器を摘出し、4%パラホルムアルデヒドで固定後、包埋剤を用いて凍結試料を作製した。クライオスタットで厚さ10マイクロメートルの切片を作り、乾燥後に、5%スキムミルクを含むPBS、100倍希釈した実施例1で得られたモノクローナル抗体MC-1 (mAb12) 溶液、フルオレッセンイソチオシアネート (FITC)、ラベルされた抗ラット免疫グロブリン (タゴ社) と順次反応させた後、蛍光顕微鏡を用いて、エビモルフィンの発現様式を調べた。尚、上記の各反応の間に、PBSで十分に洗浄を行い、非特異的な抗体の吸着をおさえた。図10に示すように、エビモルフィンは、胎児期および成獣の臓器再生期で発現量が增大していることが確認できた。

【0133】

【発明の効果】本発明のエビモルフィンは、上皮組織の形態形成作用を有する間充織成分であるので、エビモルフィンそれ自体は、先天性の上皮形態異常症はもとより、各種の臓器の損傷や、脱毛等、後天的な上皮形態の異常の治療薬の開発等に有用である。特に、可溶性に改変したエビモルフィンは、精製が容易であり、更に、所望の濃度の溶液として利用できる長所を有する。

配列

```

Met Arg Asp Arg Leu Pro Asp Leu Thr Ala Cys Arg Lys Asn Asp Asp
      5              10              15
Gly Asp Thr Val Val Val Val Glu Lys Asp His Phe Met Asp Asp Phe
      20              25              30
Phe His Gln Val Glu Glu Ile Arg Asn Ser Ile Asp Lys Ile Thr Gln
      35              40              45
Tyr Val Glu Glu Val Lys Lys Asn His Ser Ile Ile Leu Ser Ala Pro
      50              55              60
Asn Pro Glu Gly Lys Ile Lys Glu Glu Leu Glu Asp Leu Asn Lys Glu
      65              70              75              80
Ile Lys Lys Thr Ala Asn Lys Ile Arg Ala Lys Leu Lys Ala Ile Glu
      85              90              95
Gln Ser Phe Asp Gln Asp Glu Ser Gly Asn Arg Thr Ser Val Asp Leu
      100             105             110
Arg Ile Arg Arg Thr Gln His Ser Val Leu Ser Arg Lys Phe Val Glu
      115             120             125
Ala Met Ala Glu Tyr Asn Glu Ala Glu Thr Leu Phe Arg Glu Arg Ser
      130             135             140
Lys Gly Arg Ile Gln Arg Gln Leu Glu Ile Thr Gly Arg Thr Thr Thr
      145             150             155             160

```

【0134】また、エビモルフィンをコードする遺伝子は、エビモルフィンの大量生産を可能にする他、上記疾患の診断、及び治療法の開発等に極めて有用なものである。また、エビモルフィンに対する抗体は、エビモルフィンの精製、エビモルフィンの検出、上記疾患の診断、及び治療法の開発等に極めて有用なものである。

【0135】

【配列表】

配列番号 : 1

配列の長さ : 36

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA

配列

ATG CGG GAC CGG CTG CCA GAC CTG ACG GCG TGT AGG

【0136】配列番号 : 2

配列の長さ : 11

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Met Arg Asp Arg Leu Pro Asp Leu Thr Ala Cys

【0137】配列番号 : 3

配列の長さ : 288

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

(30)

特開平6-293800

57
 Asp Asp Glu Leu Glu Glu Met Leu Glu Ser Gly Lys Pro Ser Ile Phe
 165 170 175
 Thr Ser Asp Ile Ile Ser Asp Ser Gln Ile Thr Arg Gln Ala Leu Asn
 180 185 190
 Glu Ile Glu Ser Arg His Lys Asp Ile Met Lys Leu Glu Thr Ser Ile
 195 200 205
 Arg Glu Leu His Glu Met Phe Met Asp Met Ala Met Phe Val Glu Thr
 210 215 220
 Gln Gly Glu Met Ile Asn Asn Ile Glu Arg Asn Val Met Asn Ala Thr
 225 230 235 240
 Asp Tyr Val Glu His Ala Lys Glu Glu Thr Lys Lys Ala Ile Lys Tyr
 245 250 255
 Gln Ser Lys Ala Arg Arg Lys Lys Trp Ile Ile Ile Ala Val Ser Val
 260 265 270
 Val Leu Val Val Ile Ile Val Leu Ile Ile Gly Leu Ser Val Gly Lys
 275 280 285

58

【0138】配列番号 : 4

トポロジー : 直鎖状

配列の長さ : 287

配列の種類 : ペプチド

配列の型 : アミノ酸

配列

Met Arg Asp Arg Leu Pro Asp Leu Thr Ala Cys Arg Lys Asn Asp Asp
 5 10 15
 Gly Asp Thr Val Val Val Val Glu Lys Asp His Phe Met Asp Asp Phe
 20 25 30
 Phe His Gln Val Glu Glu Ile Arg Asn Ser Ile Asp Lys Ile Thr Gln
 35 40 45
 Tyr Val Glu Glu Val Lys Lys Asn His Ser Ile Ile Leu Ser Ala Pro
 50 55 60
 Asn Pro Glu Gly Lys Ile Lys Glu Glu Leu Glu Asp Leu Asn Lys Glu
 65 70 75 80
 Ile Lys Lys Thr Ala Asn Lys Ile Arg Ala Lys Leu Lys Ala Ile Glu
 85 90 95
 Gln Ser Phe Asp Gln Asp Glu Ser Gly Asn Arg Thr Ser Val Asp Leu
 100 105 110
 Arg Ile Arg Arg Thr Gln His Ser Val Leu Ser Arg Lys Phe Val Glu
 115 120 125
 Ala Met Ala Glu Tyr Asn Glu Ala Gln Thr Leu Phe Arg Glu Arg Ser
 130 135 140
 Lys Gly Arg Ile Gln Arg Gln Leu Glu Ile Thr Gly Arg Thr Thr Thr
 145 150 155 160
 Asp Asp Glu Leu Glu Glu Met Leu Glu Ser Gly Lys Pro Ser Ile Phe
 165 170 175
 Thr Ser Asp Ile Ile Ser Asp Ser Gln Ile Thr Arg Gln Ala Leu Asn
 180 185 190
 Glu Ile Glu Ser Arg His Lys Asp Ile Met Lys Leu Glu Thr Ser Ile
 195 200 205
 Arg Glu Leu His Glu Met Phe Met Asp Met Ala Met Phe Val Glu Thr
 210 215 220
 Gln Gly Glu Met Ile Asn Asn Ile Glu Arg Asn Val Met Asn Ala Thr
 225 230 235 240

(31)

特開平6-293800

59
 Asp Tyr Val Glu His Ala Lys Glu Glu Thr Lys Lys Ala Ile Lys Tyr
 245 250 255
 Gln Ser Lys Ala Arg Arg Lys Leu Met Phe Ile Ile Ile Cys Val Ile
 260 265 270
 Val Leu Leu Val Ile Leu Gly Ile Ile Leu Ala Thr Thr Leu Ser
 275 280 285

60

【0139】配列番号 : 5

配列の長さ : 277

配列の型 : アミノ酸

* トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

*

配列

Met Arg Asp Arg Leu Pro Asp Leu Thr Ala Cys Arg Lys Asn Asp Asp
 5 10 15
 Gly Asp Thr Val Val Val Val Glu Lys Asp His Phe Met Asp Asp Phe
 20 25 30
 Phe His Gln Val Glu Glu Ile Arg Asn Ser Ile Asp Lys Ile Thr Gln
 35 40 45
 Tyr Val Glu Glu Val Lys Lys Asn His Ser Ile Ile Leu Ser Ala Pro
 50 55 60
 Asn Pro Gln Gly Lys Ile Lys Glu Glu Leu Glu Asp Leu Asn Lys Glu
 65 70 75 80
 Ile Lys Lys Thr Ala Asn Lys Ile Arg Ala Lys Leu Lys Ala Ile Glu
 85 90 95
 Gln Ser Phe Asp Gln Asp Glu Ser Gly Asn Arg Thr Ser Val Asp Leu
 100 105 110
 Arg Ile Arg Arg Thr Gln His Ser Val Leu Ser Arg Lys Phe Val Glu
 115 120 125
 Ala Met Ala Glu Tyr Asn Glu Ala Gln Thr Leu Phe Arg Glu Arg Ser
 130 135 140
 Lys Gly Arg Ile Gln Arg Gln Leu Glu Ile Thr Gly Arg Thr Thr Thr
 145 150 155 160
 Asp Asp Glu Leu Glu Glu Met Leu Glu Ser Gly Lys Pro Ser Ile Phe
 165 170 175
 Thr Ser Asp Ile Ile Ser Asp Ser Gln Ile Thr Arg Gln Ala Leu Asn
 180 185 190
 Glu Ile Glu Ser Arg His Lys Asp Ile Met Lys Leu Glu Thr Ser Ile
 195 200 205
 Arg Glu Leu His Glu Met Phe Met Asp Met Ala Met Phe Val Glu Thr
 210 215 220
 Gln Gly Glu Met Ile Asn Asn Ile Glu Arg Asn Val Met Asn Ala Thr
 225 230 235 240
 Asp Tyr Val Glu His Ala Lys Glu Glu Thr Lys Lys Ala Ile Lys Tyr
 245 250 255
 Gln Ser Lys Ala Arg Arg Gln Gln His Cys His Ser Asn His Ile Pro
 260 265 270
 Arg Ala Ile Tyr Pro
 275

【0140】配列番号 : 6

配列の長さ : 867

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA

配列

(32)

特開平6-293800

61

62

ATG CCG GAC CCG CTG CCA GAC CTG ACG GCG TGT AGG AAG AAT GAT GAT 16
 GGA GAC ACA GTT GTT GTG GTT GAG AAA GAT CAT TTC ATG GAT GAT TTC 32
 TTC CAT CAG GTG GAG GAG ATT AGA AAC AGT ATT GAT AAA ATA ACT CAA 48
 TAT GTT GAA GAA GTA AAG AAA AAC CAC AGC ATC ATT CTT TCT GCA CCA 64
 AAC CCG GAA GGA AAA ATA AAA GAA GAG CTT GAA GAT CTG AAC AAA GAA 80
 ATC AAG AAA ACT GCG AAT AAA ATT CGA GCC AAG TTA AAG GCT ATT GAA 96
 CAA AGT TTT GAT CAG GAT GAG AGT GGG AAC CCG ACT TCA GTG GAT CTT 112
 CCG ATA CGA AGA ACC CAG CAT TCG GTG CTG TCT CCG AAG TTT GTG GAA 128
 GCC ATG GCG GAG TAC AAT GAG GCA CAG ACT CTG TTT CCG GAG CCG AGC 144
 AAA GGC CCG ATC CAG CCG CAG CTG GAG ATA ACT GGG AGA ACC ACC ACA 160
 GAC GAC GAG CTA GAA GAG ATG CTG GAG AGC GGG AAG CCA TCC ATC TTC 176
 ACT TCC GAC ATT ATA TCA GAT TCA CAA ATT ACT AGA CAA GCT CTC AAT 192
 GAA ATC GAG TCA CGT CAC AAG GAC ATC ATG AAG CTG GAG ACC AGC ATC 208
 CGA GAG TTG CAT GAG ATG TTC ATG GAC ATG GCT ATG TTT GTG GAG ACT 224
 CAG GGT GAA ATG ATC AAC AAC ATA GAA AGA AAT GTT ATG AAT GCC ACA 240
 GAC TAT GTA GAA CAC GCT AAA GAA GAA ACA AAA AAA GCT ATC AAA TAT 256
 CAG AGC AAG GCA AGA AGG AAA AAG TGG ATA ATT ATT GCT GTG TCA GTG 272
 GTT CTG GTT GTC ATA ATC GTT CTA ATT ATT GGC TTG TCA GTT GGC AAA 288
 TGA 289

【0141】配列番号 : 7

配列の長さ : 864

配列の型 : 核酸

20 * 鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

* 配列の種類 : cDNA

配列

ATG CCG GAC CCG CTG CCA GAC CTG ACG GCG TGT AGG AAG AAT GAT GAT 16
 GGA GAC ACA GTT GTT GTG GTT GAG AAA GAT CAT TTC ATG GAT GAT TTC 32
 TTC CAT CAG GTG GAG GAG ATT AGA AAC AGT ATT GAT AAA ATA ACT CAA 48
 TAT GTT GAA GAA GTA AAG AAA AAC CAC AGC ATC ATT CTT TCT GCA CCA 64
 AAC CCG GAA GGA AAA ATA AAA GAA GAG CTT GAA GAT CTG AAC AAA GAA 80
 ATC AAG AAA ACT GCG AAT AAA ATT CGA GCC AAG TTA AAG GCT ATT GAA 96
 CAA AGT TTT GAT CAG GAT GAG AGT GGG AAC CCG ACT TCA GTG GAT CTT 112
 CCG ATA CGA AGA ACC CAG CAT TCG GTG CTG TCT CCG AAG TTT GTG GAA 128
 GCC ATG GCG GAG TAC AAT GAG GCA CAG ACT CTG TTT CCG GAG CCG AGC 144
 AAA GGC CCG ATC CAG CCG CAG CTG GAG ATA ACT GGG AGA ACC ACC ACA 160
 GAC GAC GAG CTA GAA GAG ATG CTG GAG AGC GGG AAG CCA TCC ATC TTC 176
 ACT TCC GAC ATT ATA TCA GAT TCA CAA ATT ACT AGA CAA GCT CTC AAT 192
 GAA ATC GAG TCA CGT CAC AAG GAC ATC ATG AAG CTG GAG ACC AGC ATC 208
 CGA GAG TTG CAT GAG ATG TTC ATG GAC ATG GCT ATG TTT GTG GAG ACT 224
 CAG GGT GAA ATG ATC AAC AAC ATA GAA AGA AAT GTT ATG AAT GCC ACA 240
 GAC TAT GTA GAA CAC GCT AAA GAA GAA ACA AAA AAA GCT ATC AAA TAT 256
 CAG AGC AAG GCA AGA AGG AAA TTG ATG TTC ATT ATT ATT TGT GTA ATT 272
 GTT TTG CTT GTG ATC CTT GGA ATT ATC CTA GCA ACA ACA TTG TCA TAG 288

【0142】配列番号 : 8

配列の長さ : 834

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA

配列

ATG CCG GAC CCG CTG CCA GAC CTG ACG GCG TGT AGG AAG AAT GAT GAT 16
 GGA GAC ACA GTT GTT GTG GTT GAG AAA GAT CAT TTC ATG GAT GAT TTC 32
 TTC CAT CAG GTG GAG GAG ATT AGA AAC AGT ATT GAT AAA ATA ACT CAA 48
 TAT GTT GAA GAA GTA AAG AAA AAC CAC AGC ATC ATT CTT TCT GCA CCA 64
 AAC CCG GAA GGA AAA ATA AAA GAA GAG CTT GAA GAT CTG AAC AAA GAA 80

63

64

ATC AAG AAA ACT GCG AAT AAA ATT CGA GCC AAG TTA AAG GCT ATT GAA 96
 CAA AGT TTT GAT CAG GAT GAG AGT GGG AAC CGG ACT TCA GTG GAT CTT 112
 CGG ATA CGA AGA ACC CAG CAT TCG GTG CTG TCT CGG AAG TTT GTG GAA 128
 GCC ATG GCG GAG TAC AAT GAG GCA CAG ACT CTG TTT CGG GAG CGG AGC 144
 AAA GGC CGC ATC CAG CGC CAG CTG GAG ATA ACT GGG AGA ACC ACC ACA 160
 GAC GAC GAG CTA GAA GAG ATG CTG GAG AGC GGG AAG CCA TCC ATC TTC 176
 ACT TCC GAC ATT ATA TCA GAT TCA CAA ATT ACT AGA CAA GCT CTC AAT 192
 GAA ATC GAG TCA CGT CAC AAG GAC ATC ATG AAG CTG GAG ACC AGC ATC 208
 CGA GAG TTG CAT GAG ATG TTC ATG GAC ATG GCT ATG TTT GTG GAG ACT 224
 CAG GGT GAA ATG ATC AAC AAC ATA GAA AGA AAT GTT ATG AAT GCC ACA 240
 GAC TAT GTA GAA CAC GCT AAA GAA GAA ACA AAA AAA GCT ATC AAA TAT 256
 CAG AGC AAG GCA AGA AGG CAA CAA CAT TGT CAT AGC AAC CAT ATC CCA 272
 AGA GCC ATT TAT CCT TGA 278

【0143】配列番号 : 9

トポロジー: 直鎖状

配列の長さ: 289

配列の種類: ペプチド

配列の型: アミノ酸

配列

Met Arg Asp Arg Leu Pro Asp Leu Thr Ala Cys Arg Thr Asn Asp Asp
 1 5 10 15
 Gly Asp Thr Ala Val Val Ile Val Glu Lys Asp His Phe Met Asp Gly
 20 25 30
 Phe Phe His Gln Val Glu Glu Ile Arg Ser Ser Ile Ala Arg Ile Ala
 35 40 45
 Gln His Val Glu Asp Val Lys Lys Asn His Ser Ile Ile Leu Ser Ala
 50 55 60
 Pro Asn Pro Glu Gly Lys Ile Lys Glu Glu Leu Glu Asp Leu Asp Lys
 65 70 75 80
 Glu Ile Lys Lys Thr Ala Asn Arg Ile Arg Gly Lys Leu Lys Ser Ile
 85 90 95
 Glu Gln Ser Cys Asp Gln Asp Glu Asn Gly Asn Arg Thr Ser Val Asp
 100 105 110
 Leu Arg Ile Arg Arg Thr Gln His Ser Val Leu Ser Arg Lys Phe Val
 115 120 125
 Asp Val Met Thr Glu Tyr Asn Glu Ala Gln Ile Leu Phe Arg Glu Arg
 130 135 140
 Ser Lys Gly Arg Ile Gln Arg Gln Leu Glu Ile Thr Gly Arg Thr Thr
 145 150 155 160
 Thr Asp Asp Glu Leu Glu Glu Met Leu Glu Ser Gly Lys Pro Ser Ile
 165 170 175
 Phe Ile Ser Asp Ile Ile Ser Asp Ser Gln Ile Thr Arg Gln Ala Leu
 180 185 190
 Asn Glu Ile Glu Ser Arg His Lys Asp Ile Met Lys Leu Glu Thr Ser
 195 200 205
 Ile Arg Glu Leu His Glu Met Phe Met Asp Met Ala Met Phe Val Glu
 210 215 220
 Thr Gln Gly Glu Met Val Asn Asn Ile Glu Arg Asn Val Val Asn Ser
 225 230 235 240
 Val Asp Tyr Val Glu His Ala Lys Glu Glu Thr Lys Lys Ala Ile Lys
 245 250 255
 Tyr Gln Ser Lys Ala Arg Arg Lys Lys Trp Ile Ile Ala Ala Val Ala

(34)

特開平6-293800

65

66

260 265 270
Val Ala Val Ile Ala Val Leu Ala Leu Ile Ile Gly Leu ser Val Gly
275 280 285

Lys

【0144】配列番号 : 10

*トポロジー: 直鎖状

配列の長さ: 288

配列の種類: ペプチド

配列の型 : アミノ酸

配列

Met Arg Asp Arg Leu Pro Asp Leu Thr Ala Cys Arg Thr Asn Asp Asp
1 5 10 15
Gly Asp Thr Ala Val Val Ile Val Glu Lys Asp His Phe Met Asp Gly
20 25 30
Phe Phe His Gln Val Glu Gln Ile Arg Ser Ser Ile Ala Arg Ile Ala
35 40 45
Gln His Val Glu Asp Val Lys Lys Asn His Ser Ile Ile Leu Ser Ala
50 55 60
Pro Asn Pro Glu Gly Lys Ile Lys Glu Glu Leu Glu Asp Leu Asp Lys
65 70 75 80
Glu Ile Lys Lys Thr Ala Asn Arg Ile Arg Gly Lys Leu Lys Ser Ile
85 90 95
Glu Gln Ser Cys Asp Gln Asp Glu Asn Gly Asn Arg Thr Ser Val Asp
100 105 110
Leu Arg Ile Arg Arg Thr Gln His Ser Val Leu Ser Arg Lys Phe Val
115 120 125
Asp Val Met Thr Glu Tyr Asn Glu Ala Gln Ile Leu Phe Arg Glu Arg
130 135 140
Ser Lys Gly Arg Ile Gln Arg Gln Leu Glu Ile Thr Gly Arg Thr Thr
145 150 155 160
Thr Asp Asp Glu Leu Glu Glu Met Leu Glu Ser Gly Lys Pro Ser Ile
165 170 175
Phe Ile Ser Asp Ile Ile Ser Asp Ser Gln Ile Thr Arg Gln Ala Leu
180 185 190
Asn Glu Ile Glu Ser Arg His Lys Asp Ile Met Lys Leu Glu Thr Ser
195 200 205
Ile Arg Glu Leu His Glu Met Phe Met Asp Met Ala Met Phe Val Glu
210 215 220
Thr Gln Gly Glu Met Val Asn Asn Ile Glu Arg Asn Val Val Asn Ser
225 230 235 240
Val Asp Tyr Val Glu His Ala Lys Glu Glu Thr Lys Lys Ala Ile Lys
245 250 255
Tyr Gln Ser Lys Ala Arg Arg Lys Val Met Phe Val Leu Ile Cys Val
260 265 270
Val Thr Leu Leu Val Ile Leu Gly Ile Ile Leu Ala Thr Ala Leu Ser
275 280 285

【0145】配列番号 : 11

トポロジー: 直鎖状

配列の長さ: 279

配列の種類: ペプチド

配列の型 : アミノ酸

配列

Met Arg Asp Arg Leu Pro Asp Leu Thr Ala Cys Arg Thr Asn Asp Asp
1 5 10 15

(35)

特開平6-293800

67

68

Gly Asp Thr Ala Val Val Ile Val Glu Lys Asp His Phe Met Asp Gly
 20 25 30
 Phe Phe His Gln Val Glu Glu Ile Arg Ser Ser Ile Ala Arg Ile Ala
 35 40 45
 Gln His Val Glu Asp Val Lys Lys Asn His Ser Ile Ile Leu Ser Ala
 50 55 60
 Pro Asn Pro Glu Gly Lys Ile Lys Glu Glu Leu Glu Asp Leu Asp Lys
 65 70 75 80
 Glu Ile Lys Lys Thr Ala Asn Arg Ile Arg Gly Lys Leu Lys Ser Ile
 85 90 95
 Glu Gln Ser Cys Asp Gln Asp Glu Asn Gly Asn Arg Thr Ser Val Asp
 100 105 110
 Leu Arg Ile Arg Arg Thr Gln His Ser Val Leu Ser Arg Lys Phe Val
 115 120 125
 Asp Val Met Thr Glu Tyr Asn Glu Ala Gln Ile Leu Phe Arg Glu Arg
 130 135 140
 Ser Lys Gly Arg Ile Gln Arg Gln Leu Glu Ile Thr Gly Arg Thr Thr
 145 150 155 160
 Thr Asp Asp Glu Leu Glu Glu Met Leu Glu Ser Gly Lys Pro Ser Ile
 165 170 175
 Phe Ile Ser Asp Ile Ile Ser Asp Ser Gln Ile Thr Arg Gln Ala Leu
 180 185 190
 Asn Glu Ile Glu Ser Arg His Lys Asp Ile Met Lys Leu Glu Thr Ser
 195 200 205
 Ile Arg Glu Leu His Glu Met Phe Met Asp Met Ala Met Phe Val Glu
 210 215 220
 Thr Gln Gly Glu Met Val Asn Asn Ile Glu Arg Asn Val Val Asn Ser
 225 230 235 240
 Val Asp Tyr Val Glu His Ala Lys Glu Glu Thr Lys Lys Ala Ile Lys
 245 250 255
 Tyr Gln Ser Lys Ala Arg Arg Gln Gln His Cys His Ser Asn Arg Thr
 260 265 270
 Pro Arg Ala Leu Cys Pro Arg
 275

【0146】配列番号 : 12

配列の長さ : 870

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA

配列

ATG CCG GAC CCG CTG CCC GAC CTC ACG GCG TGT AGG ACA AAC GAC GAT 16
 GGA GAC ACT GCT GTC GTC ATT GTG GAG AAG GAT CAT TTC ATG GAC GGT 32
 TTC TTC CAT CAG GTA GAG GAG ATT CGA AGC AGC ATA GCC AGG ATT GCT 48
 CAG CAT GTA GAA GAC GTG AAG AAG AAC CAC AGC ATC ATC CTG TCT GCT 64
 CCA AAC CCA GAA GGA AAA ATA AAA GAA GAG CTG GAG GAC CTG GAC AAA 80
 GAG ATC AAG AAA ACT GCT AAC AGG ATC CCG GGC AAG CTG AAG TCT ATT 96
 GAG CAG AGC TGT GAT CAG GAC GAG AAT GGG AAC CGA ACT TCA GTG GAT 112
 CTG CCG ATA CGA AGG ACC CAG CAC TCG GTG CTG TCA CCG AAG TTT GTG 128
 GAC GTC ATG ACA GAA TAC AAT GAA GCG CAG ATC CTG TTC CCG GAG CGA 144
 AGC AAA GGC CGC ATC CAG CGC CAG CTG GAG ATC ACT GGG AGG ACC ACC 160
 ACT GAC GAC GAG CTG GAA GAG ATG CTG GAG AGC GGG AAG CCG TCC ATC 176
 TTC ATC TCG GAT ATT ATA TCA GAT TCA CAA ATC ACT AGG CAA GCT CTC 192

(36)

特開平6-293800

69

70

AAT GAG ATC GAG TCC CGC CAC AAA GAC ATC ATG AAG CTG GAG ACC AGC 208
 ATC CGA GAG CTG CAC GAG ATG TTC ATG GAT ATG GCC ATG TTT GTC GAG 224
 ACT CAG GGT GAA ATG GTC AAC AAC ATC GAG AGA AAT GTG GTG AAC TCT 240
 GTA GAT TAC GTG GAA CAT GCC AAG GAA GAG ACG AAG AAA GCC ATC AAA 256
 TAC CAG AGC AAG GCC AGG CGG AAA AAG TGG ATA ATT GCT GCT GTG GCG 272
 GTG GCT GTC ATT GCC GTC CTG GCT CTA ATC ATT GGC TTG TCG GTT GGC 288
 AAA TGA 290

【0147】配列番号 : 13

* 鎖の数 : 二本鎖

配列の長さ : 867

トポロジー : 直鎖状

配列の型 : 核酸

* 10 配列の種類 : cDNA

配列

ATG CGG GAC CGG CTG CCC GAC CTC ACG GCG TGT AGG ACA AAC GAC GAT 16
 GGA GAC ACT GCT GTC GTC ATT GTG GAG AAG GAT CAT TTC ATG GAC GGT 32
 TTC TTC CAT CAG GTA GAG GAG ATT CGA AGC AGC ATA GCC AGG ATT GCT 48
 CAG CAT GTA GAA GAC GTG AAG AAG AAC CAC AGC ATC ATC CTG TCT GCT 64
 CCA AAC CCA GAA GGA AAA ATA AAA GAA GAG CTG GAG GAC CTG GAC AAA 80
 GAG ATC AAG AAA ACT GCT AAC AGG ATC CGG GGC AAG CTG AAG TCT ATT 96
 GAG CAG AGC TGT GAT CAG GAC GAG AAT GGG AAC CGA ACT TCA GTG GAT 112
 CTG CGG ATA CGA AGG ACC CAG CAC TCG GTG CTG TCA CGG AAG TTT GTG 128
 GAC GTC ATG ACA GAA TAC AAT GAA GCG CAG ATC CTG TTC CGG GAG CGA 144
 AGC AAA GGC CGC ATC CAG CGC CAG CTG GAG ATC ACT GGG AGG ACC ACC 160
 ACT GAC GAC GAG CTG GAA GAG ATG CTG GAG AGC GGG AAG CGG TCC ATC 176
 TTC ATC TCG GAT ATT ATA TCA GAT TCA CAA ATC ACT AGG CAA GCT CTC 192
 AAT GAG ATC GAG TCC CGC CAC AAA GAC ATC ATG AAG CTG GAG ACC AGC 208
 ATC CGA GAG CTG CAC GAG ATG TTC ATG GAT ATG GCC ATG TTT GTC GAG 224
 ACT CAG GGT GAA ATG GTC AAC AAC ATC GAG AGA AAT GTG GTG AAC TCT 240
 GTA GAT TAC GTG GAA CAT GCC AAG GAA GAG ACG AAG AAA GCC ATC AAA 256
 TAC CAG AGC AAG GCC AGG CGG AAG GTG ATG TTC GTC CTC ATT TGT GTA 272
 GTC ACT TTG CTT GTG ATC CTT GGA ATT ATT CTC GCA ACA GCA TTG TCA 288
 TAG 289

【0148】配列番号 : 14

鎖の数 : 二本鎖

配列の長さ : 840

トポロジー : 直鎖状

配列の型 : 核酸

配列の種類 : cDNA

配列

ATG CGG GAC CGG CTG CCC GAC CTC ACG GCG TGT AGG ACA AAC GAC GAT 16
 GGA GAC ACT GCT GTC GTC ATT GTG GAG AAG GAT CAT TTC ATG GAC GGT 32
 TTC TTC CAT CAG GTA GAG GAG ATT CGA AGC AGC ATA GCC AGG ATT GCT 48
 CAG CAT GTA GAA GAC GTG AAG AAG AAC CAC AGC ATC ATC CTG TCT GCT 64
 CCA AAC CCA GAA GGA AAA ATA AAA GAA GAG CTG GAG GAC CTG GAC AAA 80
 GAG ATC AAG AAA ACT GCT AAC AGG ATC CGG GGC AAG CTG AAG TCT ATT 96
 GAG CAG AGC TGT GAT CAG GAC GAG AAT GGG AAC CGA ACT TCA GTG GAT 112
 CTG CGG ATA CGA AGG ACC CAG CAC TCG GTG CTG TCA CGG AAG TTT GTG 128
 GAC GTC ATG ACA GAA TAC AAT GAA GCG CAG ATC CTG TTC CGG GAG CGA 144
 AGC AAA GGC CGC ATC CAG CGC CAG CTG GAG ATC ACT GGG AGG ACC ACC 160
 ACT GAC GAC GAG CTG GAA GAG ATG CTG GAG AGC GGG AAG CGG TCC ATC 176
 TTC ATC TCG GAT ATT ATA TCA GAT TCA CAA ATC ACT AGG CAA GCT CTC 192
 AAT GAG ATC GAG TCC CGC CAC AAA GAC ATC ATG AAG CTG GAG ACC AGC 208
 ATC CGA GAG CTG CAC GAG ATG TTC ATG GAT ATG GCC ATG TTT GTC GAG 224
 ACT CAG GGT GAA ATG GTC AAC AAC ATC GAG AGA AAT GTG GTG AAC TCT 240
 GTA GAT TAC GTG GAA CAT GCC AAG GAA GAG ACG AAG AAA GCC ATC AAA 256

71

72

TAC CAG AGC AAG GCC AGG CGG CAA CAG CAT TGT CAT AGC AAC CGT ACC 272
CCA AGA GCT CTT TGT CCT CGG TGA 280

【0149】配列番号 : 15

鎖の数 : 二本鎖

配列の長さ : 2940

トポロジー : 直鎖状

配列の型 : 核酸

配列の種類 : cDNA

配列

GGGCGGCGG GCTGTGCGT GGCAGGCGT GCCGAGGGA GGGGCGGCG GCGGGGCGAG 60
GACCCCGGCA GCAAGAGGG GCGATCGGG CACCGGAGAG TGTGGGCGG GGCAGCTGAG 120
CGGCGGCTGC CCGGCGCTGC TGGCGGCTGG GG 152
ATG CGG GAC CGG CTG CCC GAC CTC ACG GCG TGT AGG ACA AAC GAC GAT 200
GGA GAC ACT GCT GTC GTC ATT GTG GAG AAG GAT CAT TTC ATG GAC GGT 248
TTC TTC CAT CAG GTA GAG GAG ATT CGA AGC AGC ATA GCC AGG ATT GCT 296
CAG CAT GTA GAA GAC GTG AAG AAG AAC CAC AGC ATC ATC CTG TCT GCT 344
CCA AAC CCA GAA GGA AAA ATA AAA GAA GAG CTG GAG GAC CTG GAC AAA 392
GAG ATC AAG AAA ACT GCT AAC AGG ATC CGG GGC AAG CTG AAG TCT ATT 440
GAG CAG AGC TGT GAT CAG GAC GAG AAT GGG AAC CGA ACT TCA GTG GAT 488
CTG CGG ATA CGA AGG ACC CAG CAC TCG GTG CTG TCA CGG AAG TTT GTG 536
GAC GTC ATG ACA GAA TAC AAT GAA GCG CAG ATC CTG TTC CGG GAG CGA 584
AGC AAA GGC CGC ATC CAG CGC CAG CTG GAG ATC ACT GGG AGG ACC ACC 632
ACT GAC GAC GAG CTG GAA GAG ATG CTG GAG AGC GGG AAG CGG TCC ATC 680
TTC ATC TCG GAT ATT ATA TCA GAT TCA CAA ATC ACT AGG CAA GCT CTC 728
AAT GAG ATC GAG TCC CGC CAC AAA GAC ATC ATG AAG CTG GAG ACC AGC 776
ATC CGA GAG CTG CAC GAG ATG TTC ATG GAT ATG GCC ATG TTT GTC GAG 824
ACT CAG GGT GAA ATG GTC AAC AAC ATC GAG AGA AAT GTG GTG AAC TCT 872
GTA GAT TAC GTG GAA CAT GGC AAG GAA GAG ACG AAG AAA GGC ATC AAA 920
TAC CAG AGC AAG GCC AGG CGG AAA AAG TGG ATA ATT GCT GCT GTG GCG 968
GTG GCT GTC ATT GCC GTC CTG GCT CTA ATC ATT GGC TTG TCG GTT GGC 1016
AAA 1019
TGATTGGTGA GATGGCGCTG GGTGCTTGCC TCTCCCTCAG GGTGGCAAAG GTGATGTTGG 1079
TCTCATTTG TGTAGTCACT TTGCTTGTA TCCITGGAAT TATTCTCGCA ACAGCATTTG 1139
CATAGCAACC GTACCCCAAG AGCTCTTTGT CCTGGTGAC TCCGACCATA CCTGCAGCTT 1199
AGTCAGCATC CTGTCTTCC ACGAGTGAAC CTCAGACTCC AGGGCTAGCG CCGAGCACTG 1259
AGGTTTTTAT TGGTGAAGAA GAAGAAAGCA CCGCAGAGGT TTGTAACCAT GAAACACCGC 1319
GAGCCAGTGT GATGCGACAT GCGAGCCAG AGAGCTGGG TCTCTCTCAA GGACACCACA 1379
GAGATTTTAC AACAGTGGCC TTGCTTGGT AGCTTTGAAA TAGGAATGAT TGA AAAAGCC 1439
TAATTTTAA AGACAATGTC AGTGTTAAAA ATGTATGTTG TGTGTAATTA GGGTGTGCTC 1499
TGGCTCAGC TGGCAGTGCT GACGAAGAGA CTTGAGCCA GGCCTGATCT CTGTTCAATG 1559
CTTGTTTGA GAATCATCAC AGAAGCTTTT TGTAAGCAT CTGTAAGTAA AGTTCTTTAA 1619
TCTATTAACA TCTAACTCC CTTCTAAGC TAGACACTGC CTTGGAAGG ACAATGGGCG 1679
AGCCCGGGG AGCATGAAC ACTGCCCTAC AGCCCTCAG GGCCTTCTA TAGTGCCCTC 1739
TGGTGACCT GACTAGGAAG TGTGAGGTC TGAAGGCCT TGAACGTAG CTCAGGAGG 1799
GGACAAGCAG TCACATGCCG CACTCATGTT ACTCTCCCT GTTCATGTA GCTGATGAAG 1859
TCTAAGGCA AGCGACAGT GACGATGAC CAACTCGGT GCTCACTAAA CTCAGAGAA 1919
TGGCCCGAG TACATAGCCA CTCTGGATG GCACTGAAG GACCAGTCC TCAGCCCAAC 1979
ACCCAGAGT GOCAGAGTT CTAAGAAAC CATGAAGTGT GGGATAAAGC TGTGCACTGG 2039
TTTACACTTG TGAATAGATG GCCAGCGAC CAAGTATGTG AAGGATACCA TGACTAGTGA 2099
ACTCTGCCAA CTGCTGACTG TGATGAGTGC TCACTCTACC CCAGCCTCAC TTGGTGGAT 2159
ATGAGTAGC CATGCCGGT CAGAACCCA AGTGTAGCA AGTGTACTG AACTATCTAA 2219
AAACCATGAT CCTTCAGTG GTAAGTGTG CACACTGTCA CCTCTCACA CCTCTGGTC 2279
TGACACCCCA TGTGCGGAGA GCTACTGAG CAGGCTGGG TGTGGTCTT GGTCTAGAGT 2339

73

74

TAGCCTGTAG TGCAGCCACT CCTGGCTGAT AGCTCACCTT TCGCAACCG GGAGCTCACC 2399
 CTTCCTGCTT GGAAGCTCAC ACTTCTGTC TGGGAGCTCA CCTTCTTGC CTGGGAGCTC 2459
 ACACITCCCG TCTGGGAGCT CACACTTCTT TCTGGGAGC TCACACTTCC TGCTGGGAG 2519
 CTCACCTTC CGGCTGGGA GCTCACACTT CCTGCCGCG AGCTCTGAAG ATGAACCTGG 2579
 GCTTTGAGC CTCACCTCTT CTGCATCAGT CAGTGCCATC GAATTAGCT GCAGAGACCA 2639
 TGGTACCAC CCAGGCTCCG ACCACCCACA GCCAGGTGTC CCTCCAGTCC AGCTGAGCC 2699
 CTTGGCTGC AGTGTGCTCG CAGAGCGCTC AGGAGACCTC TCGACAGGC AGGCAGCTGA 2759
 ATCTGGATT CCAGTGAATC AGGGGTGTGT GGGTGACTGA GTCAGCACTC CAGATACATC 2819
 TCTCTGCTGA CTTATAGCC TATTAAAAA TATAITTA GAATCCCTTG TTACCTTTTC 2879
 CAAGCAITTC TTCAAAATAT TTGTGTTAC ATTAAGAAAT TCTCAGAGAT GCAAAAAAAA 2939

A

2940

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の抗体による、エビモルフィン活性阻害における形態形成の異常を示す（顕微鏡写真）。

【図2】本発明の抗体による、精製エビモルフィンの電気泳動パターンを示す。

【図3】エビモルフィンcDNAを導入する場合と、しない場合のNIH/3T3のエビモルフィン発現を示すウェスタンブロットの一例を示す。

【図4】ヒトエビモルフィン、ヒトエビモルフィンアイソフォームA及びBの各cDNA（いずれも全長）をアガロースゲルで電気泳動した結果を示す。

【図5】エビモルフィンcDNAを導入する場合と、しない場合のNIH/3T3の培養下での肺上皮形態支持能を示す組織切片（顕微鏡写真）を示す。

【図6】図5で示した上皮形態を定量化したもの、すな

わち培養4日目で上皮のうちチューブ構造を保って成長しているものの割合を示す。

【図7】無細胞系で合成したヒトエビモルフィンをSDS-PAGEで電気泳動した結果を示す。

【図8】C末端に疎水領域が存在するエビモルフィンと、存在しないエビモルフィンの発現様式を示すウェスタンブロットの例を示す。

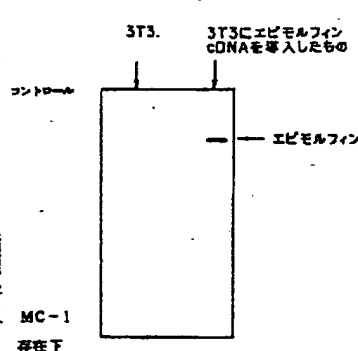
【図9】C末端に疎水領域が存在するエビモルフィンと、存在しない可溶性エビモルフィンが、いずれも肺上皮の形態形成能を有することを示す培養実験の観察像（顕微鏡写真）を示す。

【図10】本発明抗体による、エビモルフィン発現様式の調査結果（顕微鏡写真）を示す（エビモルフィンを強発現している部分は明るく染まっている）。

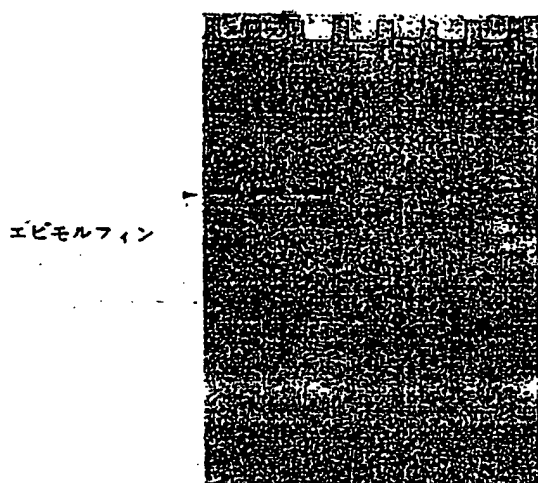
【図1】



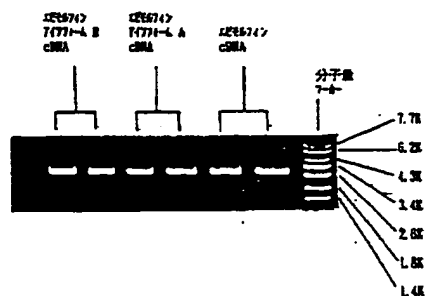
【図3】



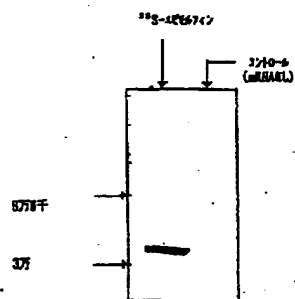
【図2】



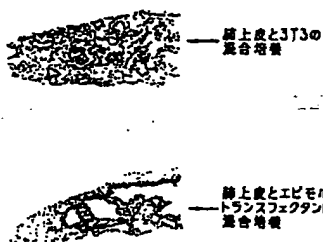
【図4】



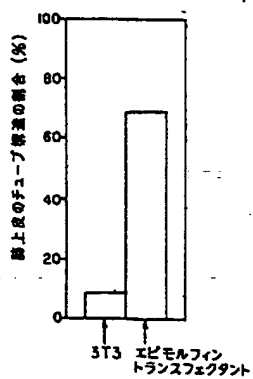
【図7】



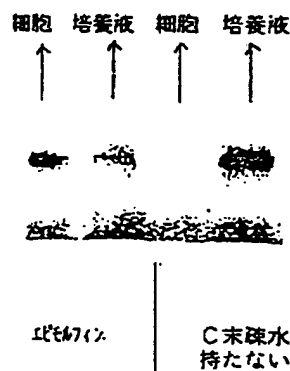
【図5】



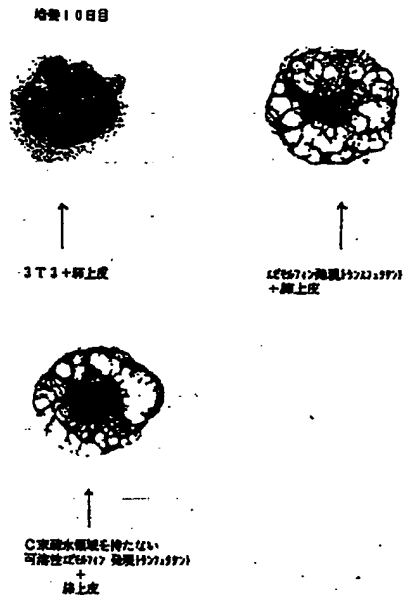
【図6】



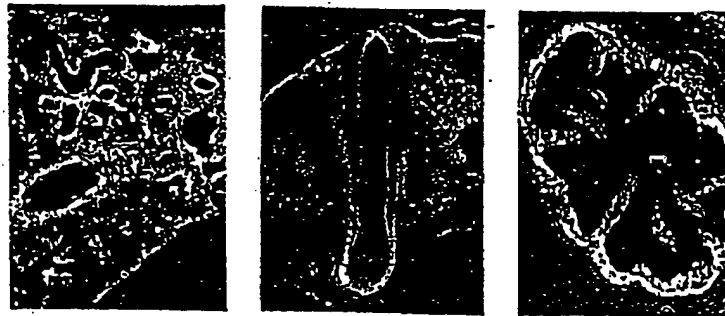
【図8】



【図9】



【図10】



15日目の胎児肺

16日目の胎児皮膚
(毛包)

15日目の胎児小腸

フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁴

C12N 15/12

C12P 21/08

G01N 33/53

33/577

識別記号

ZNA

庁内整理番号

8214-4B

D 8310-2J

B 8310-2J

FI

技術表示箇所

(41)

特開平6-293800

// A61K 37/02

ADA 8314-4C

C12N 15/06

C12P 21/02

C 8214-4B

(C12P 21/08

C12R 1:91)

(C12P 21/02

C12R 1:91)